



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

SPEKTROFOTOMETRIE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU SE ZAMĚŘENÍM NA PEROXID VODÍKU

SPECTROPHOTOMETRY OF ROS SPECIES WITH FOCUS ON HYDROGEN PEROXIDE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

LUKÁŠ ZHORNÝ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Lukáš Zhorný

ID: 147464

Ročník: 3

Akademický rok: 2014/2015

NÁZEV TÉMATU:

Spektrofotometrie reaktivních forem kyslíku se zaměřením na peroxid vodíku

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Prostudujte aplikaci spektrofotometrických metod v kvalitativní a kvantitativní analýze reaktivních forem kyslíku se zaměřením na peroxid vodíku (literární rešerše). 2) Navrhněte vhodné aplikovatelné spektrofotometrické metody na stanovení reaktivních forem kyslíku na základě literární rešerše. 3) Proveďte posouzení vlivu interferentů na výsledky spektrofotometrické analýzy. 4) Porovnejte získané výsledky (pro jednotlivé metody vzájemně) a konfrontujte je s literaturou. 5) Proveďte spektrofotometrické analýzy na vybraném rostlinném modelu. 6) Výsledky zpracujte (korelační analýza) a diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] BHANDARI, A., KIM, W., HOHN, K. Luminol-Based Enhanced Chemiluminescence Assay for Quantification of Peroxidase and Hydrogen Peroxide in Aqueous Solutions: Effect of Reagent pH and Ionic Strength. *Journal of Environmental Engineering-Asce* 136, 2010, 1147-1152.

[2] NAGARAJA, P., SHIVAKUMAR, A., SHRESTHA, A. K. Quantification of hydrogen peroxide and glucose using 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone hydrochloride with 10,11-dihydro-5H-benz(b,f)azepine as chromogenic probe. *Analytical Biochemistry* 395, 2009, 231-236.

Termín zadání: 9.2.2015

Termín odevzdání: 29.5.2015

Vedoucí práce: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Konzultanti bakalářské práce: doc. Pharm.Dr. Petr Babula, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Hlavním tématem této práce je spektrofotometrie. V první kapitole je teoreticky popsána problematika daného tématu, důležité jednotky a vztahy pro výpočet absorbancí roztoků o daných koncentracích. Dále je zde popsán spektrofotometr, jeho jednotlivé části a princip, na kterém je přístroj založen. Poslední kapitola teoretického úvodu této práce je zaměřena na tvorbu ROS v živých organismech a zejména v rostlinách a dále je zde uvedeno několik spektrofotometrických metod pro stanovení koncentrace ROS. V praktické části práce je popsána metoda využívající TiCl_4 a metoda využívající KI. Obě metody byly použity pro stanovení koncentrace peroxidu vodíku a následné měření absorbance roztoků standardů peroxidu vodíku s přidanými interferujícími látkami. Poté je provedena statistická analýza těchto naměřených dat a posouzení vlivu těchto interferentů na míru absorbance. První ze zmíněných metod se ukázala jako vhodnější pro daná měření.

KLÍČOVÁ SLOVA

Absorbance, transmittance, Lambert – Beerův zákon, vlnová délka, spektrofotometrické metody, peroxid vodíku, interferující látky.

ABSTRACT

The main theme of this work is spectrophotometry. The first chapter describes the theoretical problems of the topic, relevant units and formulas for calculating the absorbance of the solutions of given concentrations. Further disclosed herein is a spectrophotometer, its individual parts, and the principle on which the unit is based. The last chapter of the theoretical introduction to this work is focused on the production of ROS in living organisms and especially in plants, and then there are some spectrophotometric methods for determining the concentration of ROS. The practical part describes the method using $TiCl_4$ and method using KI. Both methods were used to determine the hydrogen peroxide concentration and subsequent measurement of absorbance of solutions of standard hydrogen peroxide added interfering substances. Then, the statistical analysis of the measured data and the assessment of the impact of these interferents to measure absorbance. The first of these methods proved to be suitable for a given measurement.

KEYWORDS

Absorbance, transmittance, Lambert - Beer law, wavelength, spectrophotometric methods, hydrogen peroxide, interfering substances.

ZHORNÝ, L. *Spektrofotometrie reaktivních forem kyslíku se zaměřením na peroxid vodíku*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 64 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Spektrofotometrie reaktivních forem kyslíku se zaměřením na peroxid vodíku jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce prof. ing. Ivo Provazníkovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Petru Babulovi, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při praktickém měření a následném zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. RNDR. Jaromíru Baštincovi za pomoc při statistickém zpracování naměřených dat.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

OBSAH

Úvod	7
1 Spektrofotometrie	8
1.1. Základní jednotky a vztahy pro spektrofotometrii.....	8
1.1.1. Absorbance	8
1.1.2. Transmitance.....	9
1.1.3. Lambert – Beerův zákon.....	10
2 Spektrofotometr	12
2.1. Zdroj světelného záření.....	12
2.2. Monochromátor	12
2.3. Absorpční prostředí.....	13
2.4. Detekční systém.....	13
3 Spektrofotometrické metody ve kvantifikaci ROS	15
3.1. Reaktivní formy kyslíku (ROS).....	15
3.2. Spektrofotometrické stanovení peroxidu vodíku	17
3.2.1 Metoda využívající jodid draselný.....	17
3.2.2. Metoda s hydrochinonem a anilinem.....	18
3.2.3. Metoda s xylenolovou oranží (FOX).....	18
3.2.4. Metoda s Amplex Red	19
3.2.5. Metoda s aminoantipyrinem a fenolem	19
3.2.6. Metoda s aminoantipyrinem a 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonovou kyselinou.....	20
3.2.7. Metoda využívající $TiCl_4$	20
4 Cíle bakalářské práce	21
5 Praktická část	22
5.1. Použité chemikálie, přístroje a pomůcky	22

5.2.	Stanovení absorbance roztoků TiCl_4 metodou	23
5.3.	Stanovení absorbance roztoků metodou využívající KI	23
6	Vyhodnocení naměřených dat	25
6.1.	Měření absorbance metodou využívající TiCl_4	25
6.2.	Vliv interferujících látek u metody s TiCl_4	30
6.3.	Měření absorbance metodou využívající KI.....	40
6.4.	Vliv interferujících látek u metody s KI	45
7	Závěr	55
8	Seznam obrázků	57
9	Seznam použitých zkratk	60
10	Literatura	61

ÚVOD

Spektrofotometrie dnes patří k základním optickým laboratorním metodám, bez kterých se laboratoře neobejdou. Spektrofotometr, tak jak ho známe dnes, musel projít dlouhým vývojem, než se dostal na stůl každé laboratoře.

Cílem této práce je seznámení se základními pojmy a vztahy, dále o základních faktech o elektromagnetickém spektru a metody výpočtu neznámé koncentrace látky. Hlavní náplní práce je popsání spektrofotometrických metod, které by se daly použít ke zjištění koncentrace ROS. ROS se tvoří ve všech aerobních organismech např. v místech přenosu elektronů (mitochondrie, chloroplasty), ale také různými oxidázami.

Rostliny jsou v průběhu svého života vystavovány působení řady stresových faktorů, které mohou nejen omezovat jejich životní funkce, ale přímo poškodit jejich orgány a v krajním případě to může vést až k samotnému uhynutí rostliny. Výzkumem se však zjistilo, že ROS nejsou jen negativně působící molekuly, ale mohou také regulovat expresi genů, růst nebo interakci s patogeny.

Cílem práce je ověřit, jak tyto interferující látky přítomné v rostlinách, a tedy i v analytu, mohou ovlivnit vlastní spektrofotometrické stanovení peroxidu vodíku.

1 SPEKTROFOTOMETRIE

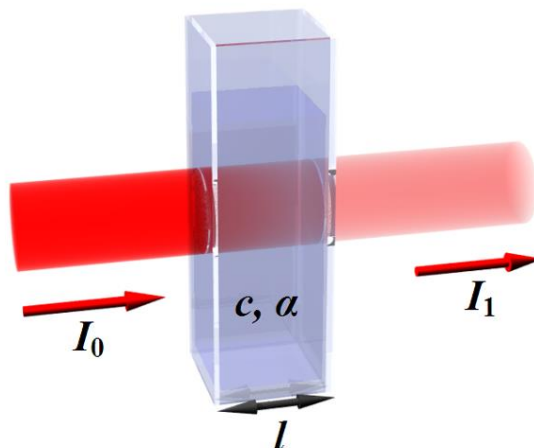
V chemických, biologických i medicínských laboratořích je k dispozici řada přístrojových metod, pomocí kterých je možné provést analýzu roztoků na základě jejich interakce se světlem. Tato práce bude zaměřena pouze na jednu z nich a to na spektrofotometrii. [1]

1.1. Základní jednotky a vztahy pro spektrofotometrii

Světlo, které projde vzorkem, je částečně tímto tělesem pohlceno (absorbováno). Tuto fyzikální vlastnost popisuje veličina, která se nazývá absorbance. Naproti tomu je veličina transmitance. Jedná se o veličinu, která vyjadřuje míru schopnosti tělesa propouštět optické záření. Nejdůležitějším vztahem, nejen pro spektrofotometrii, je Lambert – Beerův zákon. [1]

1.1.1. Absorbance

Pokud monochromatické záření (záření o dané vlnové délce) o zářivém toku P_0 projde vrstvou absorbující látky o tloušťce b , dojde k částečnému pohlcení (absorpci) tohoto záření, takže vycházející elektromagnetické záření má zářivý tok P , který je nižší, než záření dopadající na tuto látku. [1], [2]



Obr. 1: Absorbance, převzato z: [I]

Množství absorbovaného záření je vyjádřeno jako absorbance:

$$A = \log(P_0 / P) = \log(1/T) = -\log(T)$$

Rovnice 1: Výpočet absorbance [1]

Pokud nedochází k žádné absorpci záření při jeho průchodu látkou, dochází k absolutní transmitanci, která je rovna 100 % a absorbance je nulová. Pokud je veškeré záření pohlceno roztokem, tak transmitance je nulová a absorbance je rovna nekonečnu.

Velikost absorpce elektromagnetického záření závisí na třech faktorech a to na vlnové délce záření, koncentraci absorbující látky v roztoku a na tloušťce měřené vrstvy. Tloušťkou měřené vrstvy je myšlena vzdálenost na kyvetě mezi místem vstupu záření a místem výstupu záření. Tato vzdálenost se obvykle pohybuje do jednoho centimetru. [1]

1.1.2. Transmitance

Pokud nedochází k absorpci záření při jeho průchodu látkou, tak transmitance je rovna 100 % a absorbance je nulová. Pokud je veškeré záření pohlceno roztokem, tak transmitance je nulová a absorbance je nekonečno.

Množství propuštěného záření může být vyjádřeno jako transmitance:

$$T = P/P_0$$

Rovnice 2: Výpočet transmitance

Často se udává jako procento prošlého záření. [1]

1.1.3. Lambert – Beerův zákon

Empirické zjištění Lamberta, že vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy a transmitancí je exponenciální, vedlo k zavedení další veličiny absorbance A (starší název extinkce nebo optická hustota), která je definována jako logaritmus převrácené hodnoty transmitance nebo také jako záporný dekadický logaritmus transmitance:

$$A = -\log(T)$$

Rovnice 3: Absorbance

Beer dále prokázal, že absorbance je lineární funkcí koncentrace absorbující látky c . [1]

Spojením obou vztahů byl definován **Lambertův-Beerův zákon**,

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot b$$

Rovnice 4: Lambert - Beerův zákon

kde A značí absorbanci, ε_{λ} lineární koeficient absorpce, c je koncentrace roztoku a b nám určuje tloušťku absorbující vrstvy. [1]

Jak ukazují tyto vztahy, tak absorbance je přímo úměrná tloušťce absorbující vrstvy a koncentraci absorbující látky. Tzv. molární absorpční koeficient (ε_{λ}) je konstanta, která odpovídá absorbanci roztoku látky o daných hodnotách koncentrace (1 mol/l), tloušťky vrstvy (1 cm) a za daných laboratorních podmínek jako je teplota, tlak nebo také složení roztoku. Pro hodnotu absorbance je podstatná vlnová délka použitého

světla. Zvláště proto se při určování koncentrace látky provádí měření na maximu i na minimu absorpční křivky. Zákon není použitelný na všechny vzorky, ale jeho platnost je omezena na zředěné roztoky při použití přísně monochromatického světla, kdy absorbující částice nepodléhají žádným interakcím. [1]

2 SPEKTROFOTOMETR

Spektrofotometry jsou přístroje měřící v oblasti viditelného i ultrafialového záření a jako monochromátory jsou zde použity hranoly nebo mřížky. Jedná se o dokonalejší přístroje, u kterých je možno vlnovou délku záření libovolně měnit. [2]

Konstrukčně se spektrofotometry dělí na jednopaprskové a dvoupaprskové. Jednopaprskový spektrofotometr měří pouze vystupující tok záření. Proto je v tomto případě nutné provést dvě měření. Jeden svazek světla prochází nejdříve srovnávacím a pak měřeným vzorkem (kyvety obsahující roztoky musí být pohyblivé). [2]

U dvoupaprskových spektrofotometrů probíhají v prostoru paprsky dva - referenční a srovnávací. Do dráhy srovnávacího paprsku se vkládá standard (nejčastěji stejná kyveta s čistým rozpouštědlem), do dráhy měřícího svazku kyveta s měřeným vzorkem. Spektrofotometr pak vyhodnocuje podíl signálu, který je úměrný intenzitě dopadajícího měřícího svazku po průchodu měřícím vzorkem a signálu, který je úměrný intenzitě dopadajícího srovnávacího svazku po průchodu standardem. Výsledný podíl je přímo brán jako hodnota propustnosti vzorku. [2]

2.1. Zdroj světelného záření

Zdroj světla je součástí spektrofotometru vyzařující světlo, které dále prochází vzorkem. Nejdůležitějším požadavkem pro tento prvek je, aby emitující záření bylo časově stálé a dostatečně intenzivní po celou dobu měření. Jako zdroje záření slouží elektrická žárovka s wolframovým vláknem (viditelná oblast – 400-800 nm), vodíková výbojka (ultrafialová oblast – 10-400 nm) a Nernstova tyčinka nebo různé zářiče (infračervená oblast – 1-760 nm). [2]

2.2. Monochromátor

Polychromatické záření zdroje se po průchodu kondenzorem odráží od zrcadla do vstupní štěrbině monochromátoru. Po zachycení a usměrnění kolimátorovým objektivem dopadá polychromatické světlo na odrazovou optickou mřížku, která světlo rozloží na barevné spektrum. Část tohoto spektra je objektivem směřována na výstupní štěrbinu monochromátoru. Výstupní štěrbinu vymezuje úzký svazek téměř

monochromatických paprsků. Mřížkou je možno otáčet pomocí voliče vlnových délek a soustřeďovat takto na výstupní štěrbinu monochromátoru světlo žádané vlnové délky.

Monochromatické světlo potom prochází kyvetou se zkoumaným roztokem a přitom dochází k jeho částečné absorpci. [1]

Optický hranol rozkládá polychromatické světlo na jednotlivé barvy na principu různého lomu světla. Světelné paprsky o kratší vlnové délce se lámou více než paprsky s delší vlnovou délkou. Tento způsob rozkladu světla se již v moderních přístrojích nepoužívá. [2]

2.3. Absorpční prostředí

Absorpční prostředí představuje u spektrofotometru kyveta s měřeným vzorkem. Existuje celá řada typů kyvet podle způsobu použití, velikosti a použitého materiálu. Podle velikosti dělíme kyvety na makro-, semimikro- a mikro-kyvety. [3]

Při práci s kyvetami je důležité dbát na jejich čistotu. Kyveta má dvě strany matné a dvě průhledné. Před měřením musí být průhledné strany dokonale čisté, jelikož nimi prochází světelný paprsek a sebemenší nečistota by mohla ovlivnit výsledky měření. [3]

V dnešní době se používají již kyvety nenálevkové. Jsou plněny přístrojem. Urychluje a usnadňuje to práci v laboratoři. [3]

Pro měření absorbance ve viditelné části spektra jsou kyvety vyráběny ze skla, případně umělé hmoty. Pro měření v UV oblasti musí být kyvety vyrobeny z křemitého skla, případně z křemene. [3]

2.4. Detekční systém

Detekční systém je složen z detektoru záření a elektronického zařízení na zpracování jeho odezvy. Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál. Pro detekci záření ve viditelné oblasti se používaly selenové hradlové fotočlánky. Dnes se používají fotonky nebo fotonásobiče, fotoodpory apod. Signál z detektoru se zpracovává v zesilovači a jeho výstup se zobrazí na číslicovém displeji. Miniaturizace a rozvoj nových technologií vedl v této oblasti k vývoji a širšímu použití detektorů na principu diodového pole. [3]

Diodové pole tvoří velké množství miniaturních fotodiod na malé ploše destičky,

na kterou dopadá světelné záření prošlé absorpčním prostředím následně rozložené monochromátorem na jednotlivé vlnové délky. Každá fotodioda detekuje světelné záření o různé vlnové délce. Příslušná vlnová délka, vhodná pro stanovovanou látku, se vybírá elektrickým zapojením příslušné fotodiody a změřením jejího fotosignálu. [3]

Svazek polychromatického záření vycházející ze zdroje dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Po rozkladu na reflexní mřížce nebo hranolu vychází z výstupní štěrbinou svazek téměř monochromatického záření, které je charakterizováno intervalem vlnových délek, které projdou výstupní štěrbinou. Střední hodnotou tohoto intervalu je nastavená vlnová délka. Velikost intervalu je závislá na konstrukci přístroje. Po průchodu absorpčním prostředím dopadá monochromatické záření na fotoelektrický detektor a vzniklý fotoproud je převeden na digitální výstup. [3]

3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY VE KVANTIFIKACI ROS

Trvalé působení „nevhodných“ podmínek (faktorů vnějšího prostředí) vnějšího prostředí na živé organismy včetně rostlin vede ke stresu. Odpovědi organismů na tento stres mohou být velmi rychlé. Mezi stresové faktory můžeme zahrnout nepříznivé působení bakterií, hub, živočichů, mikroorganismů, anebo tzv. alelopatii, což je nepříznivý vliv jedné rostliny na druhou. Soubor těchto stresových faktorů lze nazvat jako biotické. Mezi abiotické stresové faktory řadíme extrémní klimatické podmínky, jako jsou vysoké a nízké teploty, sucho a dále jsou tvořeny například nevhodným složením půdy. [4]

Všechny tyto faktory aktivují v rostlině tzv. signální molekuly, které nesou informaci o poškození dané rostliny (pletiva, buňky), a na základě těchto informací se rostlina začíná „bránit“ – dochází ke spuštění kaskády protektivních mechanismů, jak enzymových, tak neenzymových. Mezi nejvýznamnější signální molekuly patří některé reaktivní formy kyslíku (ROS), zejména peroxid vodíku, a dále reaktivní formy dusíku (RNS), zejména oxid dusnatý. ROS u rostlin hrají roli nejen signálních molekul, ale vystupují rovněž jako toxické meziprodukty aerobního metabolismu. Při narušení regulace jejich množství dochází k poškození biomolekul a následně také buněk, pletiv, celých orgánů, případně celé rostliny. [4]

3.1. Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Reaktivní sloučeniny kyslíku, častěji nazývané jako „volné kyslíkové radikály“ jsou reaktivní sloučeniny, které vznikají z kyslíku. Tvorba reaktivních forem kyslíku probíhá u všech rostlin, a to i při jejich růstu v optimálních podmínkách. Za normálních růstových podmínek je produkce reaktivních forem kyslíku v buňce nízká, ale působí-li na rostlinu stresové faktory, které naruší její buněčnou homeostázu, dochází k výraznému zvýšení koncentrace ROS v buňce. [4], [5]

Reaktivní formy kyslíku se dělí na dvě skupiny, a to na skupinu volných radikálů a skupinu látek, které nejsou volné radikály. K volným radikálům reaktivních forem kyslíku patří superoxid ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), peroxy (ROO^{\cdot}), alkoxy (RO^{\cdot}), hydroperoxy (HO_2^{\cdot}). K látkám, které nejsou volné radikály a patří ke skupině reaktivních forem kyslíku řadíme peroxid vodíku (H_2O_2) kyselinu chlornou ($HClO$),

ozon (O₃), singletový kyslík (¹O₂). U rostlin se nejčastěji tvoří singletový kyslík (¹O₂), superoxidový radikál (O₂^{·-}), hydroxylový radikál (OH[·]), hydroxylový ion (OH⁻), perhydroxylový radikál (O₂H[·]) a peroxid vodíku (H₂O₂). [4], [6]

Sloučenina	Zkratky	Struktura	Zdroj	Biologický účinek
Hydroxylový radikál	OH	$\cdot\ddot{O}-H$	Haberova-Weissova reakce, Fentonova reakce	velmi silné oxidační činidlo, poškození DNA, peroxidace lipidů, degradace proteinů, produkce C ₂ H ₄
Peroxid vodíku	H ₂ O ₂	$H-\ddot{O}-\ddot{O}-H$	glykolát oxidasa v glyoxysomech, osvětlené chloroplasty - PSII, mitochondrie v přítomnosti NADH, β-oxidace mastných kyselin, Fe-S proteiny a enzymové reakce (SOD, glykolát oxidasa, aminoxidasa, oxalát oxidasa (EC 1.2.3.4), peroxidasy.)	inhibice fixace CO ₂ , inaktivace enzymů Calvinova cyklu, oxidace sulfhydrolů a flavonolů, substrát oxidační reakce
Singletní kyslík	¹ O ₂	$O-O:$	excitované chlorofylové molekuly v tripletovém stavu, znečištění vzduchu (NO ₂ , O ₃ , atd.)	mutagenese, peroxidace lipidů, fotooxidace aminokyselin
Superoxidový anionradikál	O ₂ ⁻	$[\cdot\ddot{O}=\ddot{O}]^{-}$	osvětlené chloroplasty, PSII a PSI, mitochondrie v přítomnosti NADH, Fe-S proteiny, cytochrom P450, elektronový transportní řetězec v endoplasmatickém retikulu, herbicidy (paraquat a nitrofen), enzymové reakce: xanthinoxidasa, NAD(P)H oxidasa, aldehydoxidasa, urikáza (EC 1.7.3.3).	peroxidace lipidů, inaktivace enzymů, depolymerizace polysacharidů, reakce s H ₂ O ₂ za tvorby OH [·] , schopnost oxidovat síru, askorbát a NADPH, redukovat cytochrom c a ionty kovů

Tab. 1: Přehled ROS, převzato z: [II]

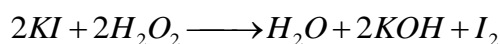
3.2. Spektrofotometrické stanovení peroxidu vodíku

Peroxid vodíku je bezbarvá, kapalná látka, jejíž bod varu se pohybuje mezi 115-157 °C a bod tání je nižší než 50 °C. Peroxid vodíku může vystupovat jako oxidační činidlo (za vzniku vody), nebo jako redukční činidlo (tvorba kyslíku) jak v kyselém, tak alkalickém prostředí. Peroxid vodíku je silnější kyselina než voda. Je proto schopen tvořit peroxidy a hydrogenperoxy. Peroxid vodíku vzniká v živé buňce v průběhu řady metabolických procesů. Zvýšená produkce peroxidu vodíku je spojena s obrannou reakcí rostlin vyvolanou působením stresových faktorů. Peroxid vodíku vystupuje jednak jako signální, ale také jako obranná molekula. [7], [8]

Koncentraci peroxidu vodíku lze stanovit řadou metod. Známé jsou metody luminiscenční, nejčastěji používající činidlo luminol, i titrační, mezi které patří jodometrie, manganometrie nebo cerimetrie. Pro detekci v rostlinách se však nejčastěji používají metody spektrofotometrické. [9]

3.2.1 Metoda využívající jodid draselný

Princip této metody spočívá v reakci mezi jodidem draselným (anorganická sloučenina, bílá sůl) a peroxidem vodíku. Kvantitativní poměr obou látek je 1:1. Při reakci vzniká jod, který lze stanovit měřením jeho absorbance při 390 nm. [10]

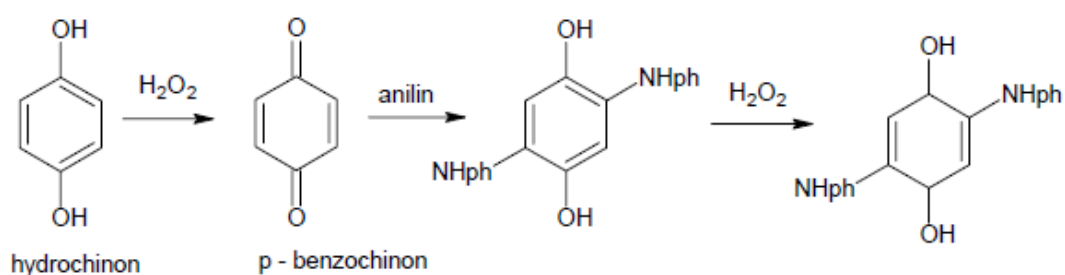


Rovnice 5: Reakce jodidu draselného s peroxidem vodíku

Metoda stanovení peroxidu vodíku s využitím jodidu draselného byla modifikována přidávkem škrobu a manganistanu draselného jako katalyzátoru. V tomto případě dochází k posunu vlnové délky, při které je monitorován produkt. Absorbance je detekována při 570 nm. Metoda je lineární do 2,9 μmol/l peroxidu vodíku. Jedná se o poměrně často používanou metodu při stanovování peroxidu vodíku v rostlinných extraktech, metoda je experimentálně i finančně nenáročná. [11], [12]

3.2.2. Metoda s hydrochinonem a anilinem

Princip metody spočívá v reakci hydrochinonu (organická látka ze skupiny fenolů, pevná látka vzhledu bílých granulí, rozpustný ve vodě), který se za přítomnosti peroxidu vodíku oxiduje na *p*-benzochinon. Tento vzniklý meziprodukt dále reaguje s anilinem (bezbarvá olejovitá kapalina, organická zásada) na konečný produkt. Tento produkt je spektrofotometricky měřitelný při 550 nm. Molybdenan amonný zde působí jako katalyzátor. Metoda je lineární do koncentrace peroxidu vodíku 0,4 μmol/l. [13]



Rovnice 6: Reakce hydrochinonu s anilinem, převzato z: [III]

3.2.3. Metoda s xylenolovou oranží (FOX)

Princip metody spočívá v oxidaci železa (II) na železo (III) peroxidem vodíku, s xylenolovou oranží, za přítomnosti sorbitolu (alkoholický cukr, náhradní sladidlo, výroba redukcí glukózy), který funguje jako katalyzátor. Reakce probíhá v kyselém prostředí a absorpční maximum barevného komplexu se nachází mezi $\lambda = 560 - 590$ nm. Železo (III) vytváří s xylenolovou oranží fialový komplex, který je spektrofotometricky měřitelný při 560 nm. Metoda je lineární do koncentrace 2 μmol/l peroxidu vodíku. [12] Způsob metody FOX byl poprvé navržen pro stanovení peroxidu vodíku v ozářených vodných roztocích. Výhodou metody je rychlost a snadná použitelnost. Metoda FOX má však i jisté nevýhody, ke kterým se řadí nízká citlivost na okolní kyslík a světlo a také její relativně nízká reprodukovatelnost. [14], [15]

3.2.4. Metoda s Amplex Red

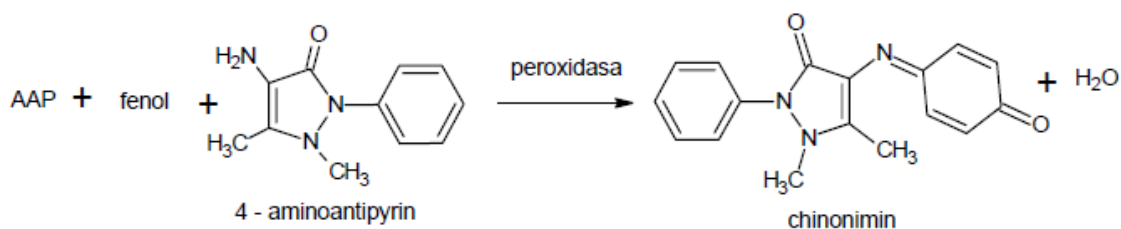
Princip metody spočívá v reakci Amplex Red s peroxidem vodíku v přítomnosti peroxidasy v kvantitativním poměru 1:1 za tvorby resorufinu, který lze stanovit měřením absorbance při 570 nm nebo fluorescence. Pro vzorky, které obsahují nízkou koncentraci peroxidu vodíku, je vhodné použít fluorescenční měření, které je lineární do 0,004 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace peroxidu vodíku a je citlivější. Naopak při vyšších koncentracích je vhodné použít měření absorbance, tato metoda je lineární do 0,3 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace peroxidu vodíku.[16]



Rovnice 7: Reakce Amplex Red s peroxidem vodíku, převzato z: [III]

3.2.5. Metoda s aminoantipyrinem a fenolem

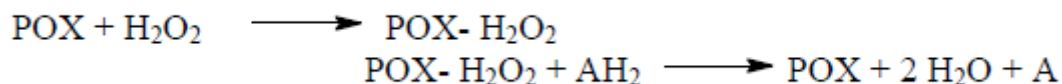
Princip metody spočívá v reakci aminoantipyrinu s peroxidem vodíku a fenolem za přítomnosti peroxidasy. Barevný produkt, chinonimin, této reakce lze stanovit měřením absorbance při 505 nm. Metoda je lineární do koncentrace 6 nmol/l peroxidu vodíku. [17]



Rovnice 8: Reakce aminoantipyrinu s peroxidem vodíku, převzato z: [III]

3.2.6. Metoda s aminoantipyrinem a 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonovou kyselinou

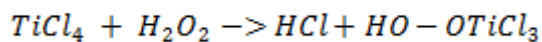
Princip metody spočívá v reakci oxidovaného aminoantipyrinu s DCHBS kyselinou. Produkt má růžovofialové zbarvení a lze jej stanovit měřením absorbance při 515 nm. Tato metoda se často používá ve spřažené reakci při stanovení diaminoxidasové aktivity. [18]



Rovnice 9: Reakce aminoantipyrinu s DCHBS, převzato z: [III]

3.2.7. Metoda využívající TiCl_4

Princip metody je založen na reagenii chloridu titaničitého (TiCl_4) s peroxidem vodíku (H_2O_2) za vzniku kyseliny chlorovodíkové (HCl) a produktu HO-OTiCl_3 . Vzniká např. žlutě zbarvený komplex měřený při vlnové délce 410 nm. Produkt vstupuje do dalších reakcí a podílí se na přeměně thiolů na sulfonylchloridy a thiosulfonáty. [19]



Rovnice 10: Reakce chloridu titaničitého s peroxidem vodíku

4 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

V úvodu práce je literární rešerše zaměřená na teoretickou aplikaci spektrofotometrických metod v kvalitativní a kvantitativní analýze reaktivních forem kyslíku se zaměřením na peroxid vodíku. Na základě této rešerše byly navrhnuty vhodné aplikovatelné spektrofotometrické metody na stanovení ROS.

Praktická část této práce se zaměřuje konkrétně na dvě vybrané spektrofotometrické metody pro stanovování ROS. Byla vybrána metoda využívající jodid draselný a metoda využívající chlorid titaničitý. Jedním z úkolů bylo provést posouzení vlivu interferentů na výsledky spektrofotometrické analýzy. Jako interferující látky byly použity dvě kyseliny a to kyselina *trans*-skořicová a *p*-kumarová. Byl sledován a zkoumán vliv těchto interferujících látek na hodnoty absorbance. Výsledky byly zpracovány v programu EXCEL 2013 a STATISTICA 10.

5 PRAKTICKÁ ČÁST

V tomto oddílu práce, budou literární poznatky o spektrofotometrických metodách aplikovány do praxe. Byly vybrány dvě metody a to metoda využívající TiCl_4 a KI . Jsou zde porovnávány základní (kalibrační) roztoky s roztoky s přidanými interferenty. Získaná data jsou vyhodnocována statisticky pomocí programu STATISTICA 10 a programu EXCEL 13. Dále byly určeny kalibrační křivky pro různé koncentrace peroxidu vodíku a byly porovnávány s křivkami jednotlivých interferentů pro obě spektrofotometrické metody. Kalibrační křivky jednotlivých interferentů byly určeny z devíti kalibračních bodů (0 – 60 $\mu\text{mol/l}$) pro obě spektrofotometrické metody. Měření probíhalo při dvou vlnových délkách 390 nm a 410 nm.

5.1. Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

Chemikálie

- Peroxid vodíku (H_2O_2) – Sigma Aldrich, USA, jako 50% roztok w/v ve vodě
- Kyselina *trans*-skořicová ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$) -Sigma Aldrich, USA
- Kyselina *p*-kumarová ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$) – Sigma Aldrich, USA
- Destilovaná voda čistoty ACS – Sigma Aldrich, USA
- Chlorid titaničitý (TiCl_4) – Sigma Aldrich, USA, čistota 99,0 %
- Jodid draselný (KI) – Sigma Aldrich, USA, BioUltra čistota 99,5 %

Přístroje a pomůcky

- Mikropipety (Fisher Scientific, Biohit)
- Zkumavky
- Kádinky
- Mikrotitrační destičky (Fisher Scientific)
- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Bio-Tek, Česká republika)

5.2. Stanovení absorbance roztoků TiCl_4 metodou

Absorbance jednotlivých roztoků ve zvoleném rozsahu koncentrací byla stanovena pomocí TiCl_4 metody. Všechny reagentie byly připraveny v čase potřeby. Postup metody byl upraven pro mikrotitrační spektrofotometrii. Měření probíhalo při vlnových délkách 390 nm a 410 nm za teploty 21 °C v kinetickém režimu a po dobu dvou hodin proti slepému vzorku. Hodnoty absorbancí byly zaznamenávány každé dvě minuty. Všechna měření byla prováděna v triplikátu.

Stanovení absorbance roztoku standardu peroxidu vodíku

Do jamek mikrotitrační destičky byl postupně napipetován roztok standardu (peroxid vodíku) pro požadovaný rozsah koncentrací 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 30, 60 $\mu\text{mol/l}$, činidlo (TiCl_4) a destilovaná voda, o celkovém objemu 200 μl .

Stanovení absorbance roztoku interferentů

Do jamek mikrotitrační destičky byl postupně napipetován roztok standardu (peroxid vodíku) pro požadovaný rozsah koncentrací 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 30, 60 $\mu\text{mol/l}$, roztok interferentů ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$, $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$) pro zvolené koncentrace 5 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$, činidlo (TiCl_4) a destilovaná voda o celkovém objemu 200 μl .

5.3. Stanovení absorbance roztoků metodou využívající KI

Absorbance jednotlivých roztoků ve zvoleném rozsahu koncentrací byla stanovena pomocí metody s KI. Všechny reagentie byly připraveny v čase potřeby. Postup metody byl upraven pro mikrotitrační spektrofotometrii. Měření probíhalo při vlnových délkách 390 nm a 410 nm za teploty 21 °C v kinetickém režimu a po dobu dvou hodin proti slepému vzorku. Hodnoty absorbancí byly zaznamenávány každé dvě minuty. Všechna měření byla prováděna v triplikátu.

Stanovení absorbance roztoku standardu peroxidu vodíku

Do jamek mikrotitrační destičky byl postupně napipetován roztok standardu (peroxid vodíku) pro požadovaný rozsah koncentrací 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 30, 60 $\mu\text{mol/l}$, činidlo (KI) a destilovaná voda o celkovém objemu 200 μl .

Stanovení absorbance roztoku interferentů

Do jamek mikrotitrační destičky byl postupně napipetován roztok standardu (peroxid vodíku) pro požadovaný rozsah koncentrací 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 30, 60 $\mu\text{mol/l}$, roztok interferentů ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$, $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$) pro zvolené koncentrace 5 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$, činidlo (KI) a destilovaná voda o celkovém objemu 200 μl .

6 VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT

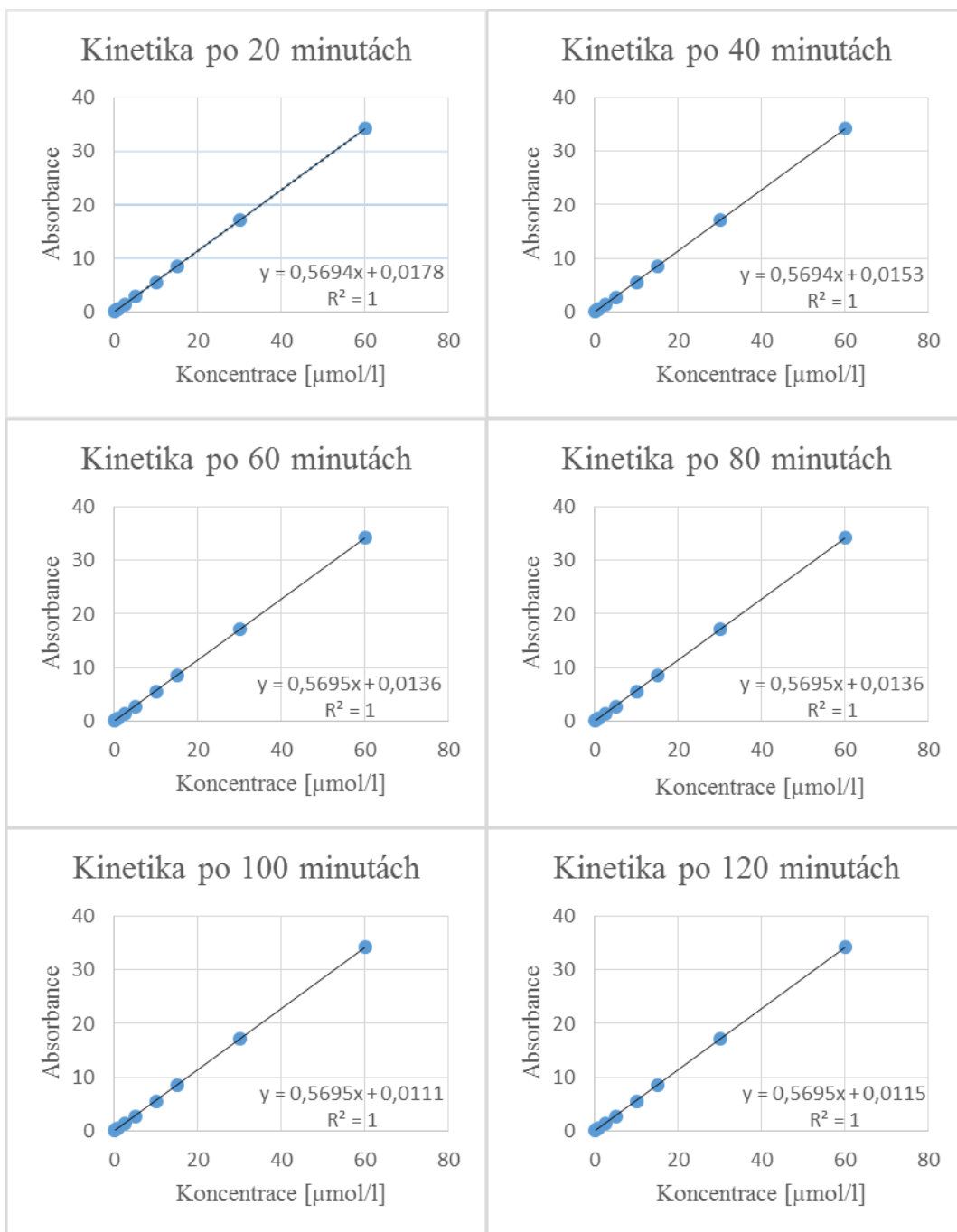
Pro statistické vyhodnocení naměřených dat byl nejprve použit Wilcoxonův test pro párové hodnoty. Poté byl proveden Kruskal – Wallisův test. Oba tyto testy byly použity pro obě metody i pro obě vlnové délky.

6.1. Měření absorbance metodou využívající TiCl_4

Kalibrační křivky peroxidu vodíku byly vypočteny metodou nejmenších čtverců z devíti kalibračních bodů (0 – 60 $\mu\text{mol/l}$). Měření probíhalo v triplikátu za výše uvedených podmínek a stanovení bylo analyzováno v časovém intervalu 120 minut s jednotlivými kroky měření po dvou minutách. Metoda využívající TiCl_4 vykazovala přesnou lineární závislost mezi absorbancí a koncentrací standardu v celém pracovním rozsahu. Důkazem jsou hodnoty spolehlivosti (R^2), které se rovnaly hodnotě jedna. Kalibrační křivky byly vytvořeny s časovým odstupem 20 minut a nebyly mezi nimi pozorovány žádné významné rozdíly. Kalibrační křivky standardu i s příslušnými rovnicemi regrese jsou uvedeny na Obr. 2 a 3 pro obě vlnové délky (410 nm, 390 nm).

Kinetika po 20 minutách			Kinetika po 40 minutách		
Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,054	0,002	0,000	0,054	0,003
0,500	0,321	0,015	0,500	0,321	0,014
1,000	0,604	0,023	1,000	0,604	0,023
2,500	1,472	0,035	2,500	1,473	0,034
5,000	2,865	0,045	5,000	2,845	0,038
10,000	5,600	0,086	10,000	5,600	0,086
15,000	8,550	0,138	15,000	8,550	0,138
30,000	17,100	0,236	30,000	17,100	0,236
60,000	34,200	0,357	60,000	34,200	0,357
Kinetika po 60 minutách			Kinetika po 80 minutách		
Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,055	0,003	0,000	0,056	0,003
0,500	0,321	0,014	0,500	0,320	0,014
1,000	0,605	0,024	1,000	0,605	0,024
2,500	1,475	0,038	2,500	1,475	0,038
5,000	2,830	0,043	5,000	2,830	0,040
10,000	5,600	0,086	10,000	5,600	0,086
15,000	8,550	0,138	15,000	8,550	0,138
30,000	17,100	0,236	30,000	17,100	0,236
60,000	34,200	0,357	60,000	34,200	0,357
Kinetika po 100 minutách			Kinetika po 120 minutách		
Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,056	0,003	0,000	0,056	0,003
0,500	0,321	0,014	0,500	0,322	0,013
1,000	0,604	0,022	1,000	0,604	0,024
2,500	1,476	0,034	2,500	1,471	0,036
5,000	2,813	0,049	5,000	2,818	0,048
10,000	5,600	0,086	10,000	5,600	0,086
15,000	8,550	0,138	15,000	8,550	0,138
30,000	17,100	0,236	30,000	17,100	0,236
60,000	34,200	0,357	60,000	34,200	0,357

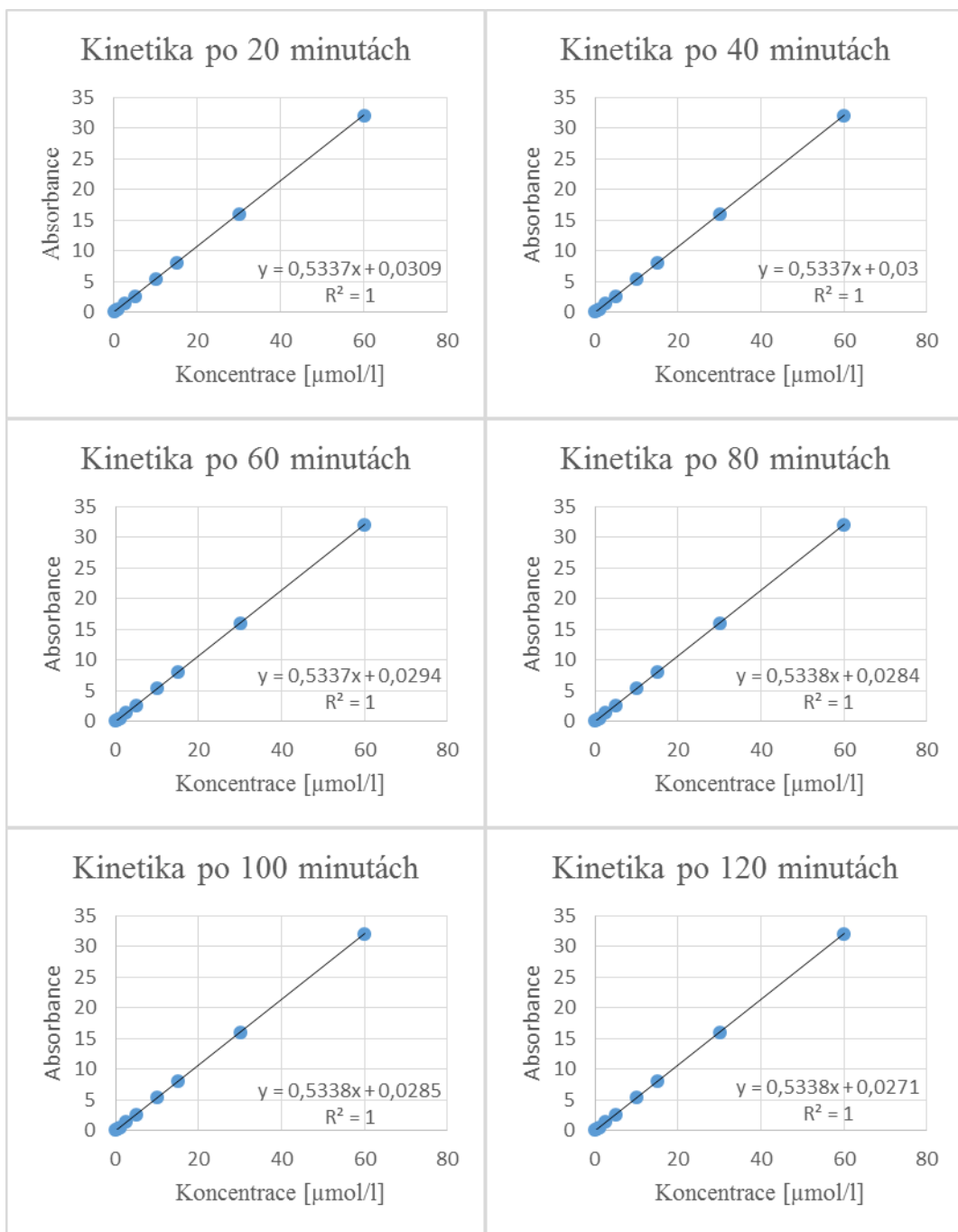
Tab. 2: Tabulka naměřených hodnot standardu (H₂O₂) pro TiCl₄ metodu (410 nm)



Obr. 2: Kalibrační křivky standardu (H₂O₂) pro TiCl₄ metodu (410 nm)

Kinetika po 20 minutách			Kinetika po 40 minutách		
Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,061	0,003	0,000	0,061	0,004
0,500	0,309	0,014	0,500	0,310	0,013
1,000	0,572	0,023	1,000	0,573	0,023
2,500	1,381	0,031	2,500	1,382	0,032
5,000	2,672	0,040	5,000	2,662	0,038
10,000	5,345	0,086	10,000	5,345	0,086
15,000	8,017	0,138	15,000	8,017	0,138
30,000	16,034	0,236	30,000	16,034	0,236
60,000	32,068	0,357	60,000	32,068	0,357
Kinetika po 60 minutách			Kinetika po 80 minutách		
Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,062	0,004	0,000	0,063	0,004
0,500	0,309	0,012	0,500	0,309	0,013
1,000	0,574	0,024	1,000	0,574	0,024
2,500	1,385	0,035	2,500	1,384	0,033
5,000	2,655	0,036	5,000	2,649	0,035
10,000	5,345	0,086	10,000	5,345	0,086
15,000	8,017	0,138	15,000	8,017	0,138
30,000	16,034	0,236	30,000	16,034	0,236
60,000	32,068	0,357	60,000	32,068	0,357
Kinetika po 100 minutách			Kinetika po 120 minutách		
Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,063	0,004	0,000	0,063	0,004
0,500	0,310	0,013	0,500	0,310	0,012
1,000	0,573	0,023	1,000	0,573	0,024
2,500	1,385	0,032	2,500	1,381	0,034
5,000	2,647	0,050	5,000	2,641	0,048
10,000	5,345	0,086	10,000	5,345	0,086
15,000	8,017	0,138	15,000	8,017	0,138
30,000	16,034	0,236	30,000	16,034	0,236
60,000	32,068	0,357	60,000	32,068	0,357

Tab. 3: Tabulka naměřených hodnot standardu (H_2O_2) pro TiCl_4 metodu (390 nm)



Obr. 3: Kalibrační křivky standardu (H₂O₂) pro TiCl₄ metodu (390 nm)

6.2. Vliv interferujících látek u metody s TiCl_4

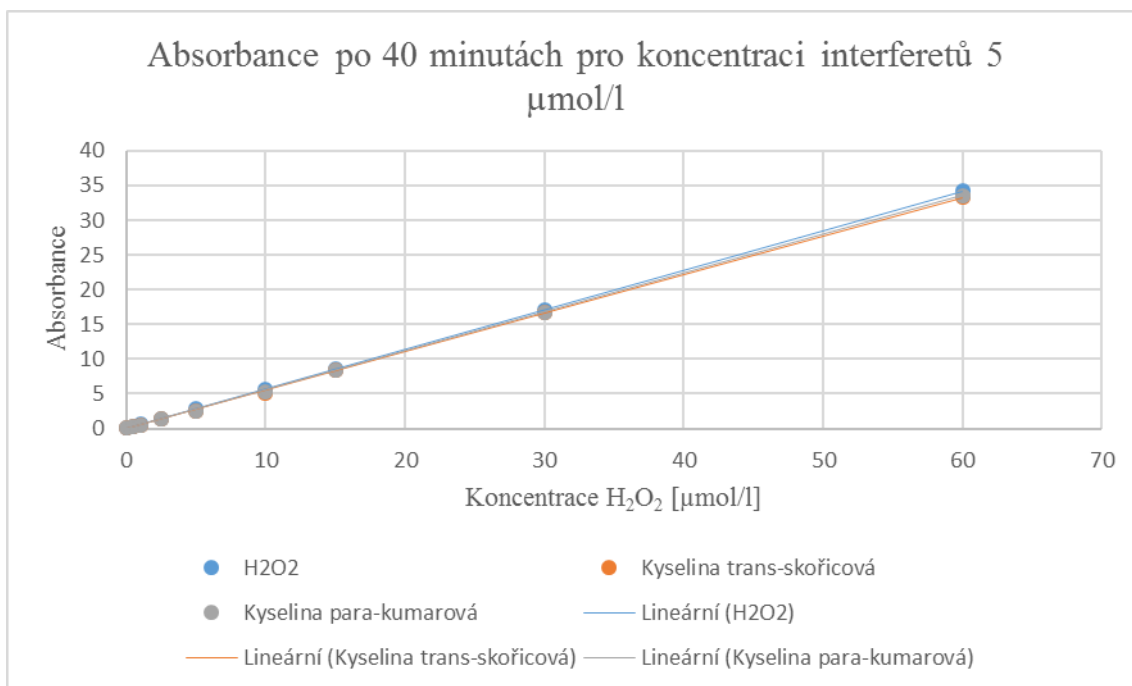
Jako interferující látky u metody s TiCl_4 byly použity kyseliny *trans*-skořicová a *p*-kumarová, které se běžně vyskytují v přírodě a jsou velmi častými látkami v rostlinných extraktech. Úkolem této práce bylo zjistit vliv těchto látek na výsledky získané za použití metody spektrofotometrického stanovení peroxidu vodíku.

Měření bylo realizováno pro dvě koncentrace u obou daných kyselin (5 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$).

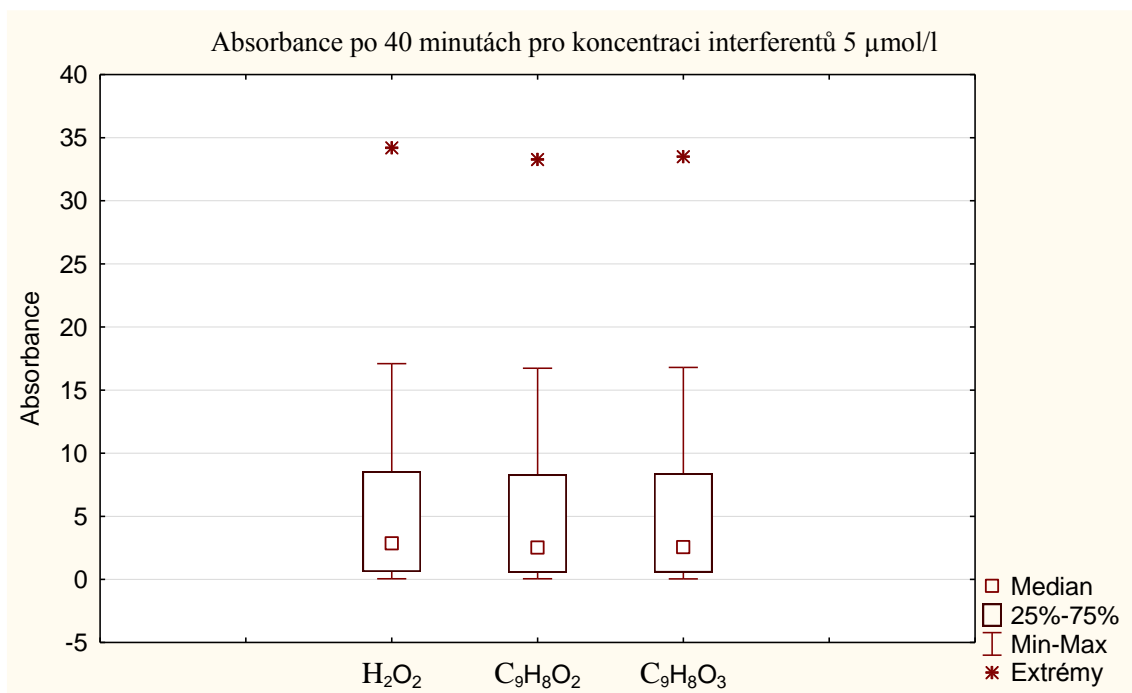
Testování vazeb interferujících látek o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ s TiCl_4

Potenciální vliv studovaných látek byl odečten na základě odklonu stanovených kalibračních křivek s nižší koncentrací testovaných interferentů oproti sklonu kalibrační křivky pro peroxid vodíku během reakční doby pro obě vlnové délky. Vliv interferentů byl porovnáván po 40 minutách a po 120 minutách (Obr. 4, Obr. 6, Obr. 8, Obr. 10). Absorbance odpovídající rušivým látkám o nižší koncentraci vykazují lineární průběh, po jednoduchém porovnání v rámci jednotlivých vzorků nebyl pozorován žádný systematický rozdíl a získané hodnoty jsou blízké těm, které odpovídají standardu jak v průběhu času, tak pro obě vlnové délky.

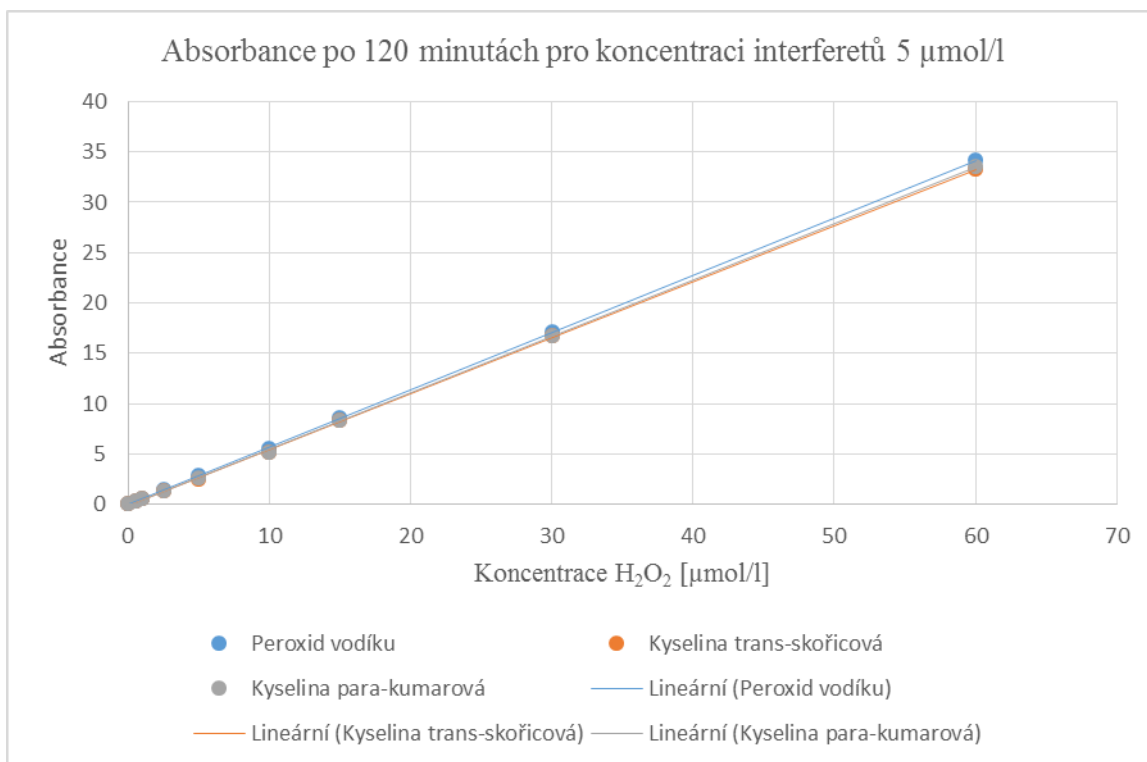
Porovnání kalibračních křivek bylo doplněno o boxploty (krabicový graf). Rozložení hodnot v těchto grafech opět ukazuje, že nízké koncentrace interferentů nemají vliv na absorbanci jednotlivých roztoků (Obr. 5, Obr. 7, Obr. 9, Obr. 11). Z těchto grafů lze vyčíst mediánová hodnota, rozptyl, minimum a maximum.



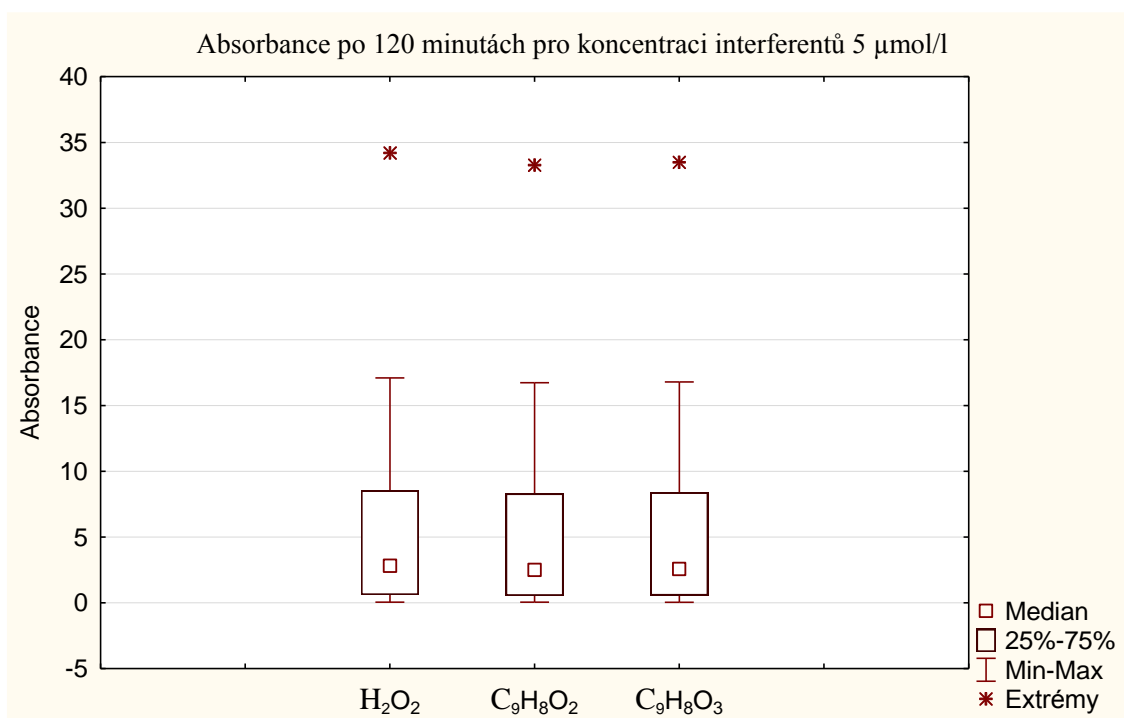
Obr. 4: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 410 nm



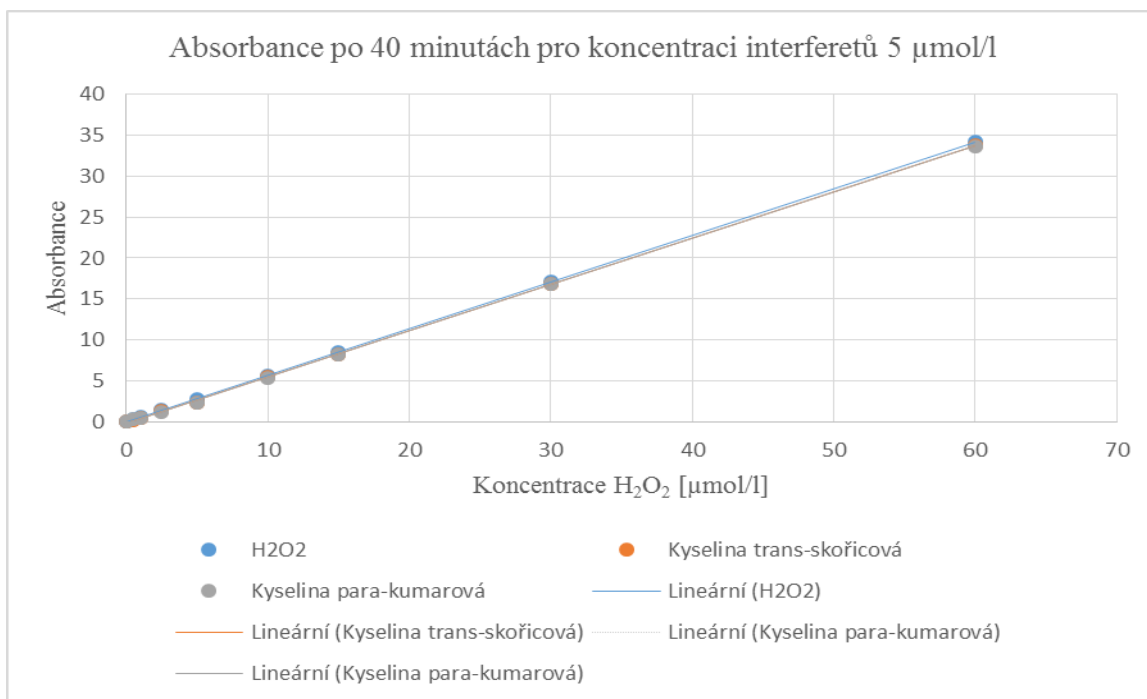
Obr. 5: Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (410 nm)



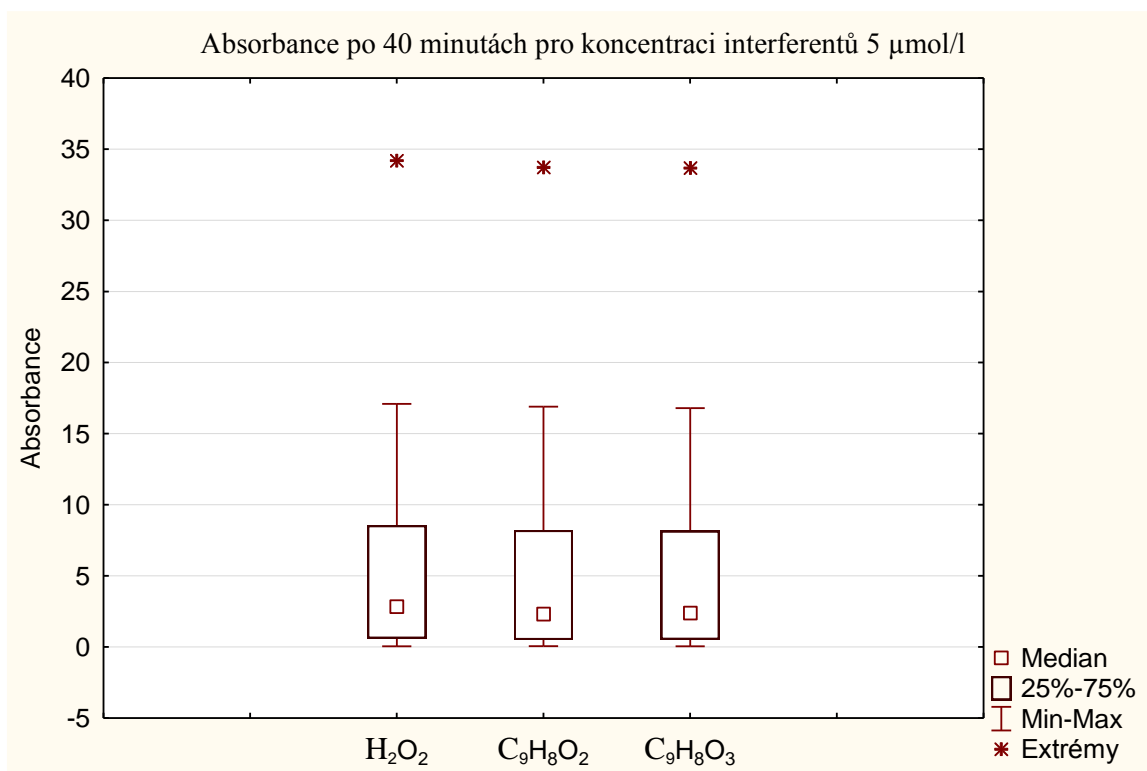
Obr. 6: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 410 nm



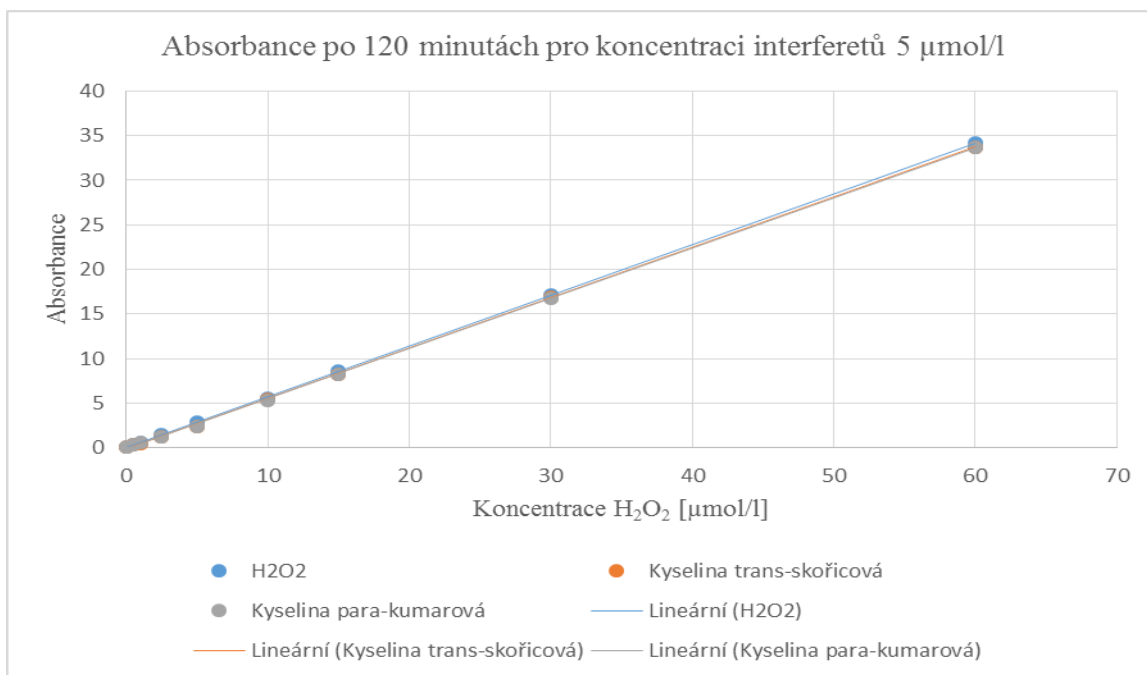
Obr. 7: Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (410 nm)



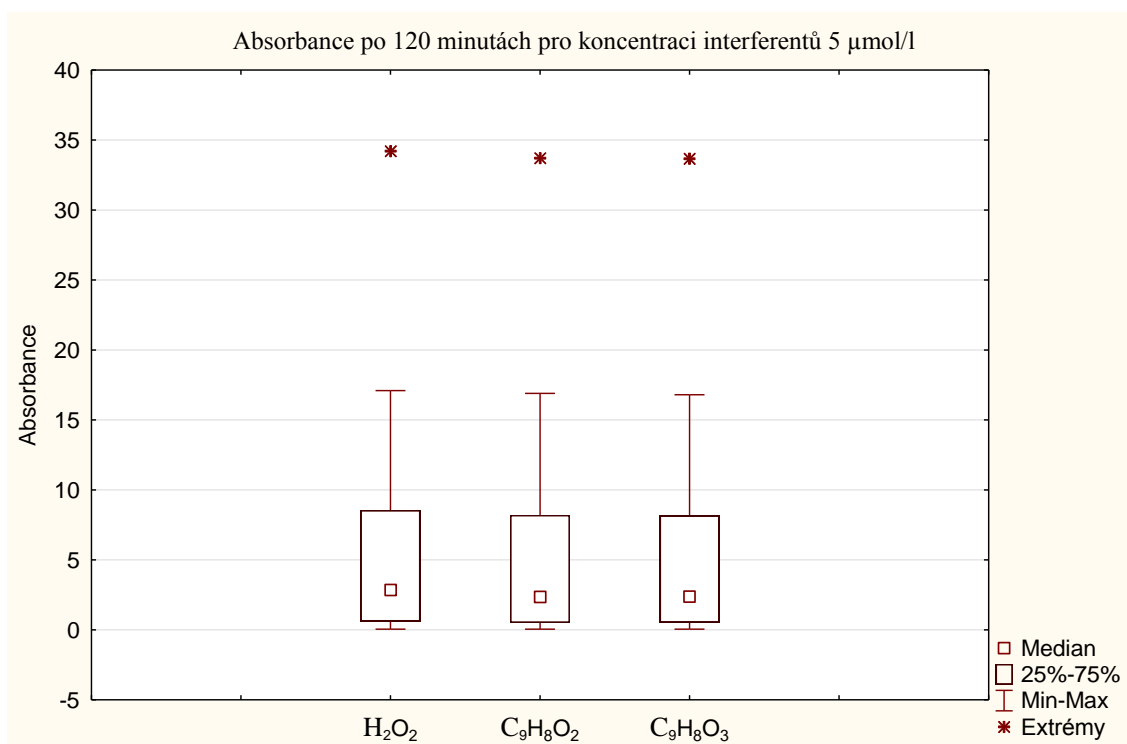
Obr. 8: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 390 nm



Obr. 9: Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (390 nm)



Obr. 10: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 390 nm

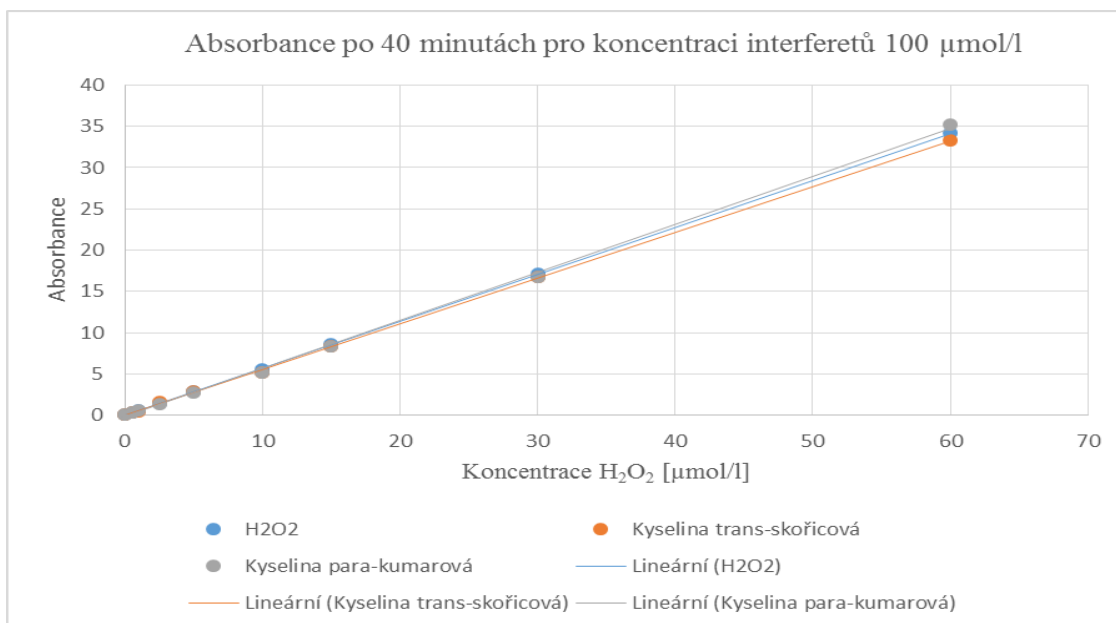


Obr. 11: Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (390 nm)

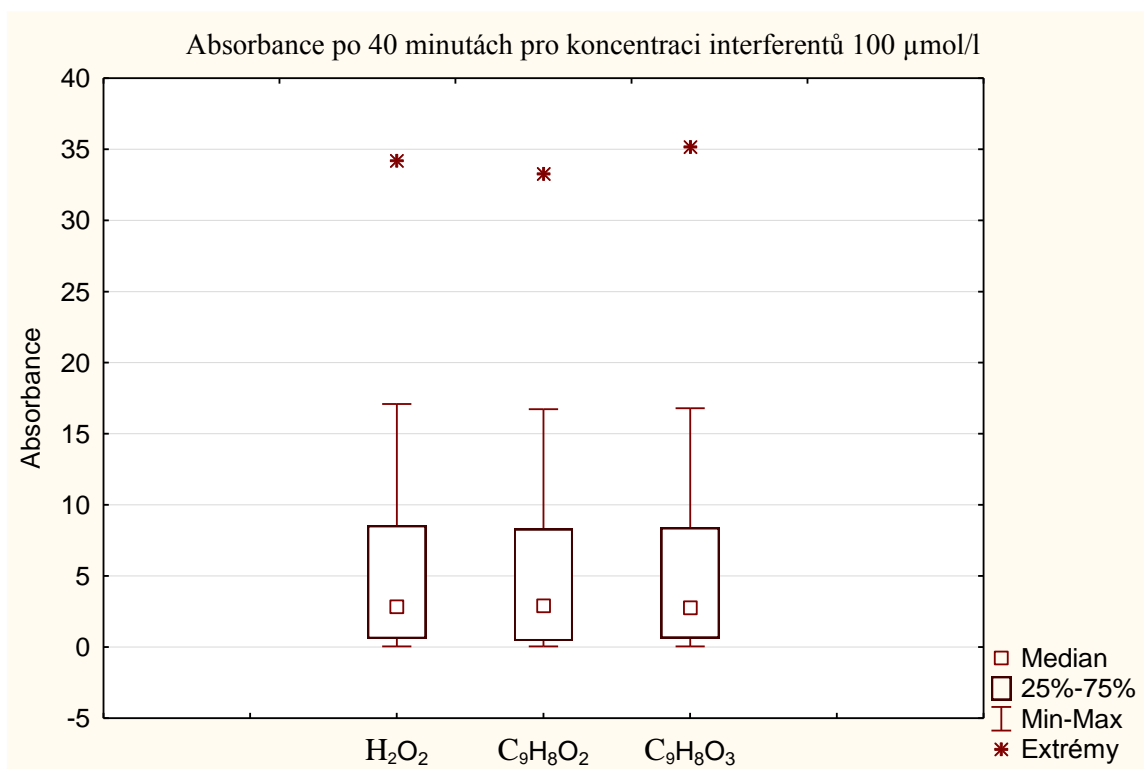
Testování vazeb interferujících látek o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ s TiCl_4

Potenciální vliv studovaných látek byl odečten na základě odklonu stanovených kalibračních křivek s vyšší koncentrací testovaných interferentů oproti sklonu kalibrační křivky pro peroxid vodíku během reakční doby pro obě vlnové délky. Vliv interferentů byl porovnáván opět po 40 minutách a po 120 minutách (Obr. 12, Obr. 14, Obr. 16, Obr. 18). Absorbance odpovídající interferujícím látkám o vyšší koncentraci vykazují téměř lineární průběh, po jednoduchém porovnání v rámci jednotlivých vzorků nebyl pozorován žádný systematický rozdíl a získané hodnoty jsou blízké těm, které odpovídají standardu jak v průběhu času, tak pro obě vlnové délky.

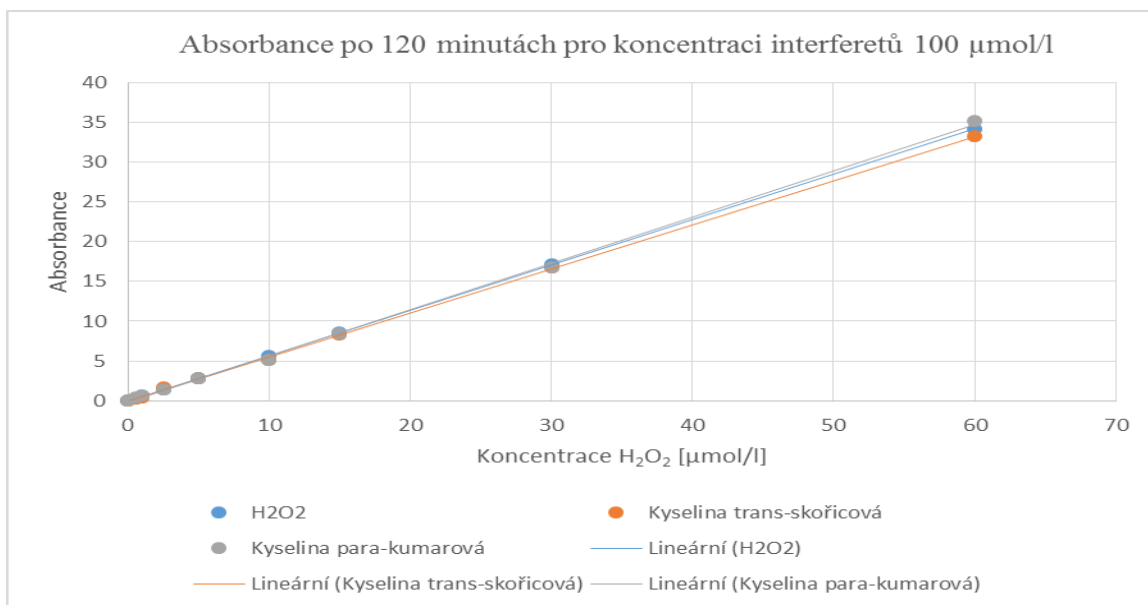
Rozložení hodnot absorbance při použití vyšší koncentrace interferentů se v daných boxplotech (Obr. 13, Obr. 15, Obr. 17, Obr. 19) opět nijak výrazně neprojevilo.



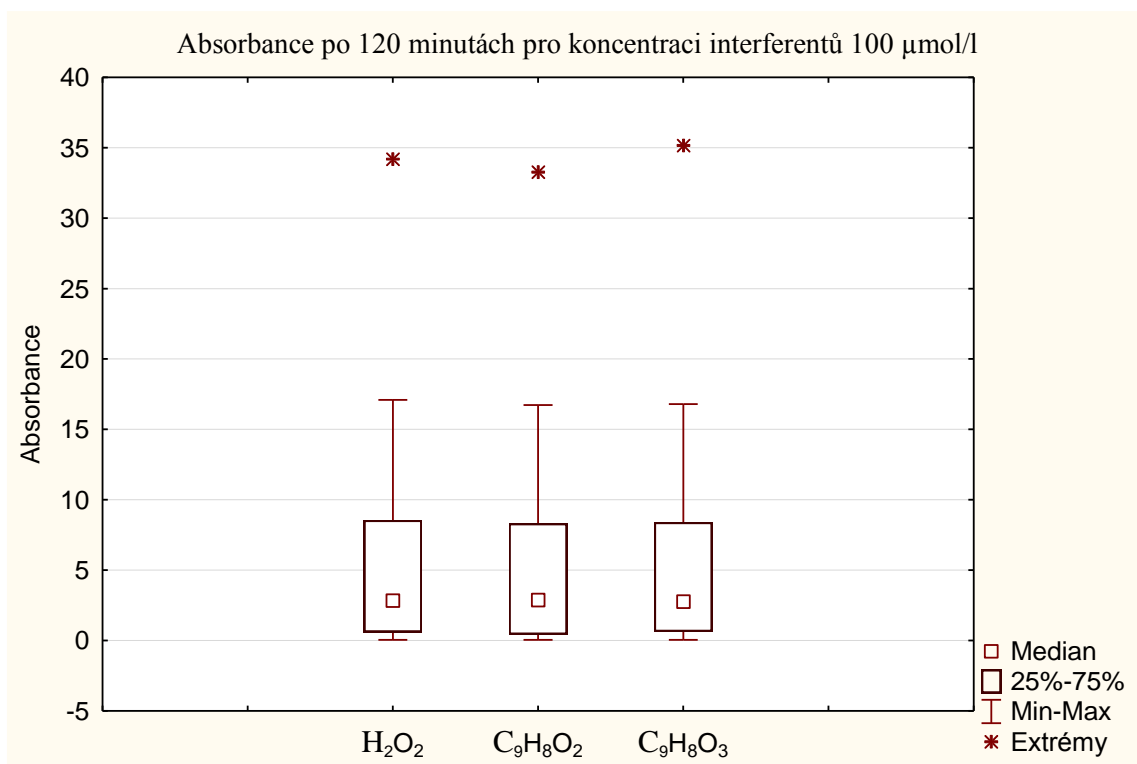
Obr. 12: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 410 nm



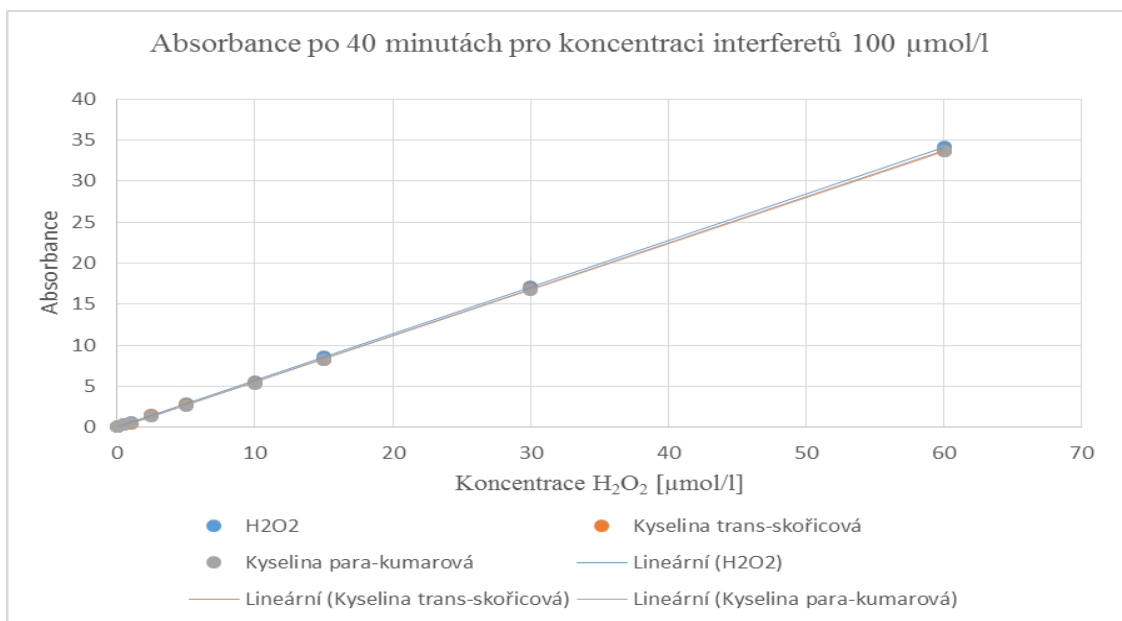
Obr. 13: Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (410 nm)



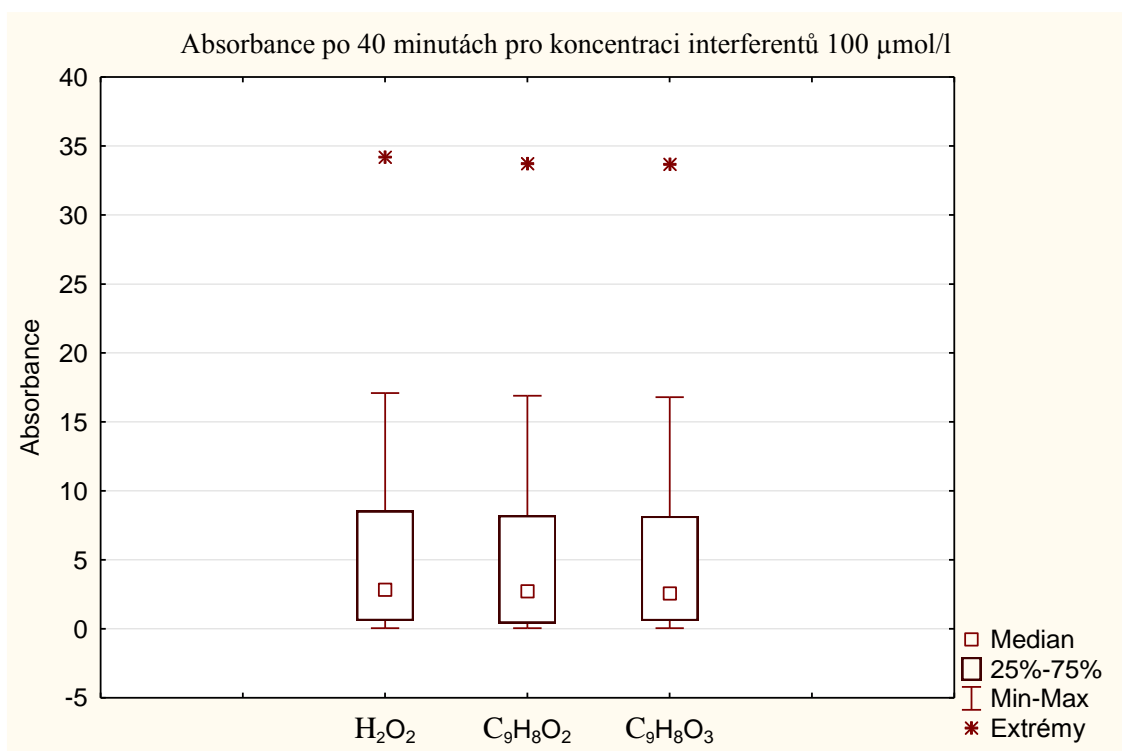
Obr. 14: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 410nm



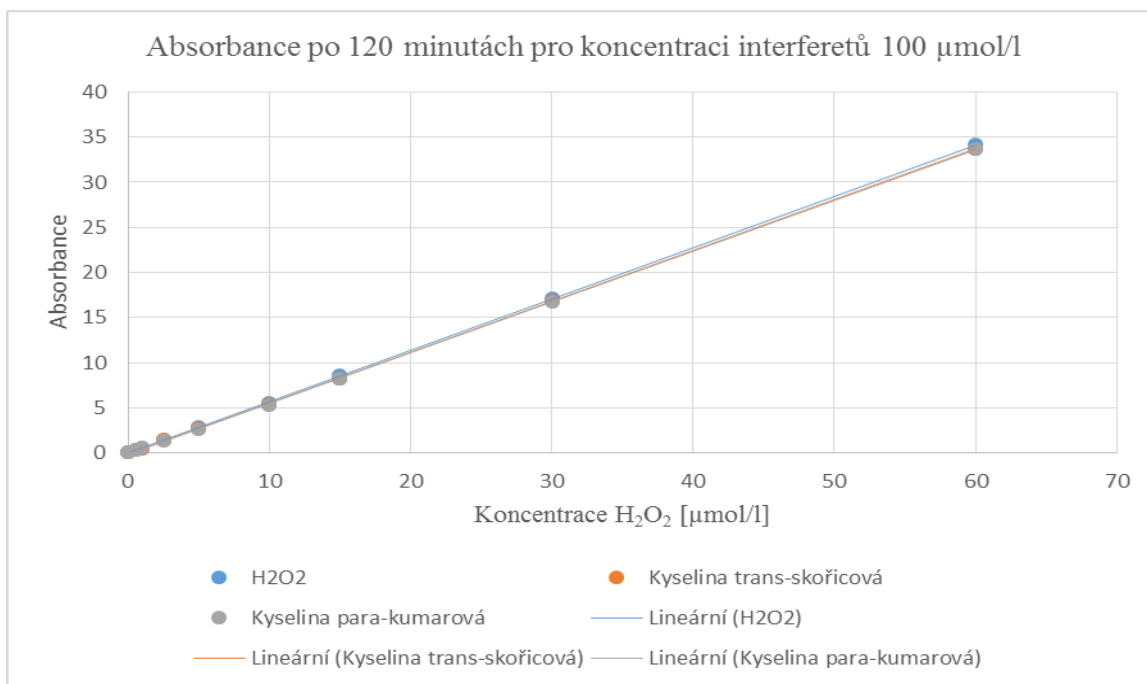
Obr. 15: Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (410 nm)



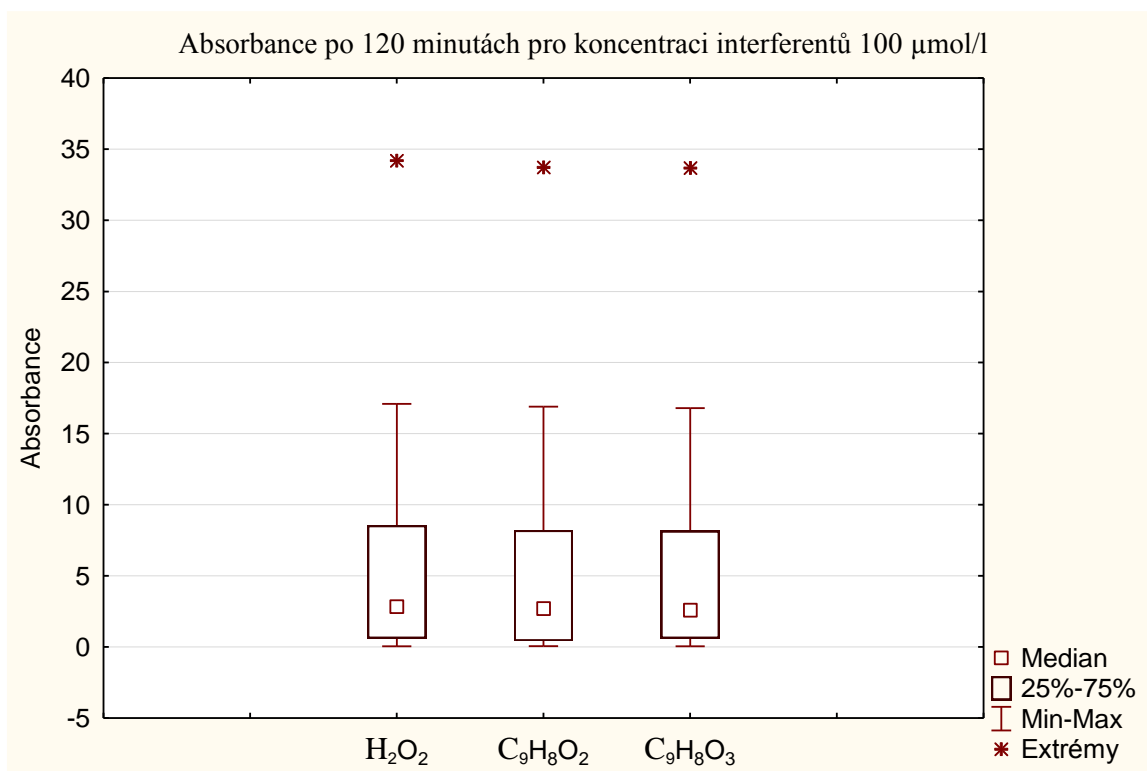
Obr. 16: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 390 nm



Obr. 17: Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (390 nm)



Obr. 18: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 390 nm



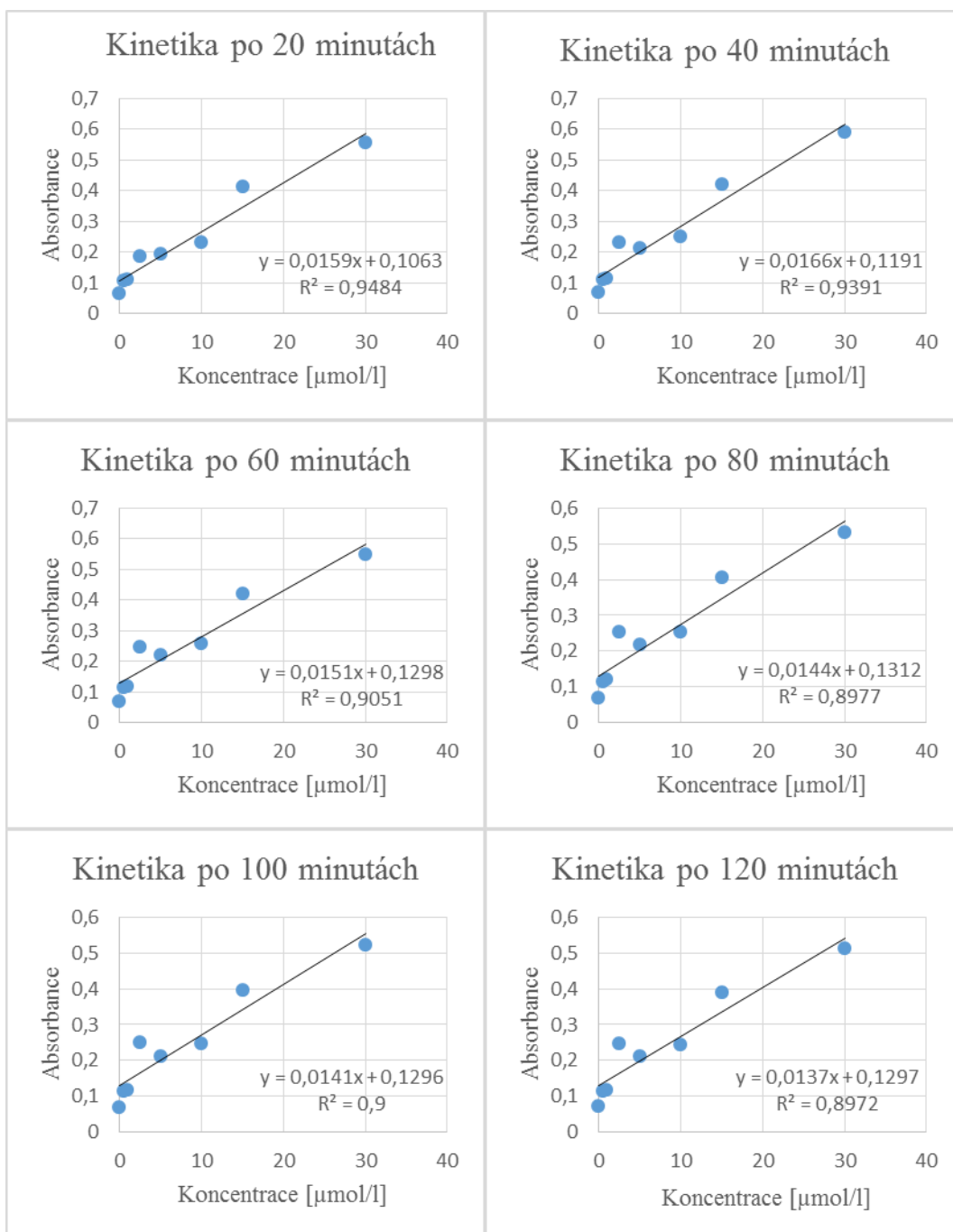
Obr. 19: Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (390 nm)

6.3. Měření absorbance metodou využívající KI

Kalibrační křivky peroxidu vodíku byly vypočteny metodou nejmenších čtverců z osmy kalibračních bodů (0 – 30 $\mu\text{mol/l}$). V tomto případě bylo použito pouze osm hodnot pro lepší grafické znázornění a rozložení hodnot podél kalibrační křivky. Měření probíhalo v triplikátu za výše uvedených podmínek a stanovení bylo analyzováno v časovém intervalu 120 minut s jednotlivými kroky měření po dvou minutách. Metoda využívající KI vykazovala téměř přesnou lineární závislost mezi absorbancí a koncentrací standardu v celém pracovním rozsahu. Kalibrační křivky byly vytvořeny s časovým odstupem 20 minut a nebyly mezi nimi pozorovány žádné významné rozdíly. Kalibrační křivky standardu jsou uvedeny na obrázku č. 20 a 21 pro obě vlnové délky (410 nm, 390 nm).

Kinetika po 20 minutách			Kinetika po 40 minutách		
Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,066	0,003	0,000	0,069	0,001
0,500	0,107	0,011	0,500	0,112	0,010
1,000	0,111	0,018	1,000	0,117	0,012
2,500	0,187	0,058	2,500	0,233	0,080
5,000	0,197	0,059	5,000	0,215	0,052
10,000	0,233	0,090	10,000	0,252	0,096
15,000	0,415	0,192	15,000	0,423	0,163
30,000	0,556	0,158	30,000	0,591	0,168
Kinetika po 60 minutách			Kinetika po 80 minutách		
Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,070	0,001	0,000	0,071	0,001
0,500	0,115	0,012	0,500	0,114	0,010
1,000	0,120	0,008	1,000	0,121	0,009
2,500	0,249	0,095	2,500	0,255	0,100
5,000	0,220	0,049	5,000	0,218	0,054
10,000	0,259	0,099	10,000	0,254	0,094
15,000	0,423	0,152	15,000	0,407	0,137
30,000	0,548	0,141	30,000	0,534	0,132
Kinetika po 100 minutách			Kinetika po 120 minutách		
Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,071	0,002	0,000	0,072	0,001
0,500	0,114	0,010	0,500	0,114	0,010
1,000	0,119	0,008	1,000	0,119	0,008
2,500	0,251	0,096	2,500	0,248	0,095
5,000	0,214	0,049	5,000	0,212	0,048
10,000	0,250	0,090	10,000	0,246	0,087
15,000	0,397	0,130	15,000	0,392	0,130
30,000	0,524	0,130	30,000	0,513	0,128

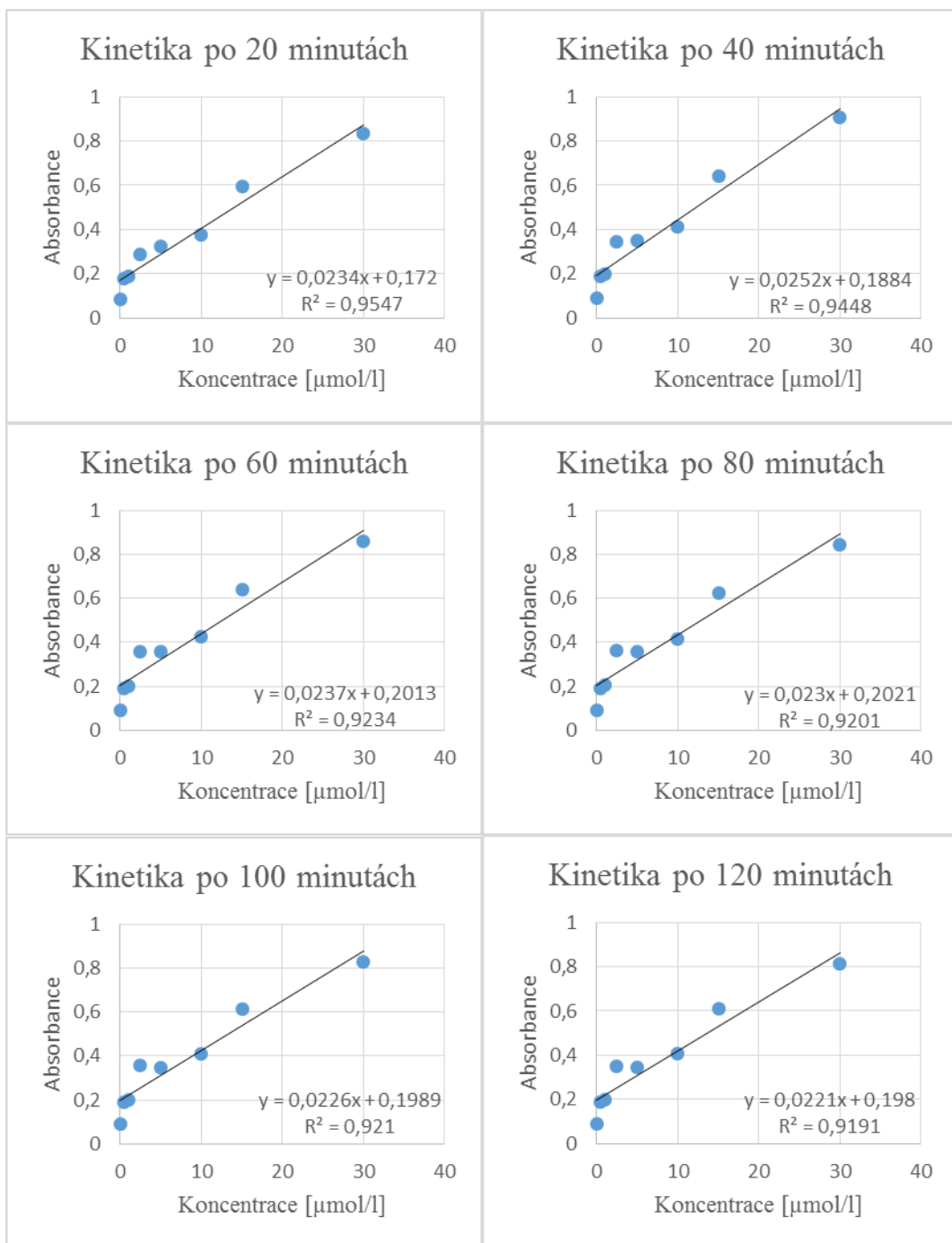
Tab. 4: Tabulka naměřených hodnot standardu (H₂O₂) pro KI metodu (410 nm)



Obr. 20: Kalibrační křivky standardu (H₂O₂) pro KI metodu (410 nm)

Kinetika po 20 minutách			Kinetika po 40 minutách		
Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,085	0,002	0,000	0,088	0,003
0,500	0,180	0,015	0,500	0,187	0,013
1,000	0,189	0,034	1,000	0,198	0,024
2,500	0,286	0,079	2,500	0,342	0,090
5,000	0,321	0,078	5,000	0,350	0,066
10,000	0,378	0,094	10,000	0,411	0,111
15,000	0,596	0,181	15,000	0,640	0,177
30,000	0,836	0,138	30,000	0,906	0,156
Kinetika po 60 minutách			Kinetika po 80 minutách		
Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,089	0,003	0,000	0,090	0,002
0,500	0,192	0,016	0,500	0,190	0,013
1,000	0,201	0,018	1,000	0,205	0,017
2,500	0,356	0,104	2,500	0,363	0,111
5,000	0,359	0,062	5,000	0,355	0,074
10,000	0,426	0,117	10,000	0,417	0,112
15,000	0,643	0,162	15,000	0,626	0,150
30,000	0,859	0,137	30,000	0,844	0,125
Kinetika po 100 minutách			Kinetika po 120 minutách		
Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka	Koncentrace [μmol/l]	Absorbance [-]	Směrodatná odchylka
0,000	0,090	0,002	0,000	0,091	0,002
0,500	0,189	0,013	0,500	0,188	0,013
1,000	0,200	0,018	1,000	0,198	0,016
2,500	0,356	0,107	2,500	0,352	0,106
5,000	0,348	0,069	5,000	0,344	0,067
10,000	0,410	0,108	10,000	0,405	0,106
15,000	0,615	0,145	15,000	0,608	0,145
30,000	0,829	0,125	30,000	0,814	0,123

Tab. 5: Tabulka naměřených hodnot standardu (H₂O₂) pro KI metodu (390 nm)



Obr. 21: Kalibrační křivky standardu (H₂O₂) pro KI metodu (390 nm)

6.4. Vliv interferujících látek u metody s KI

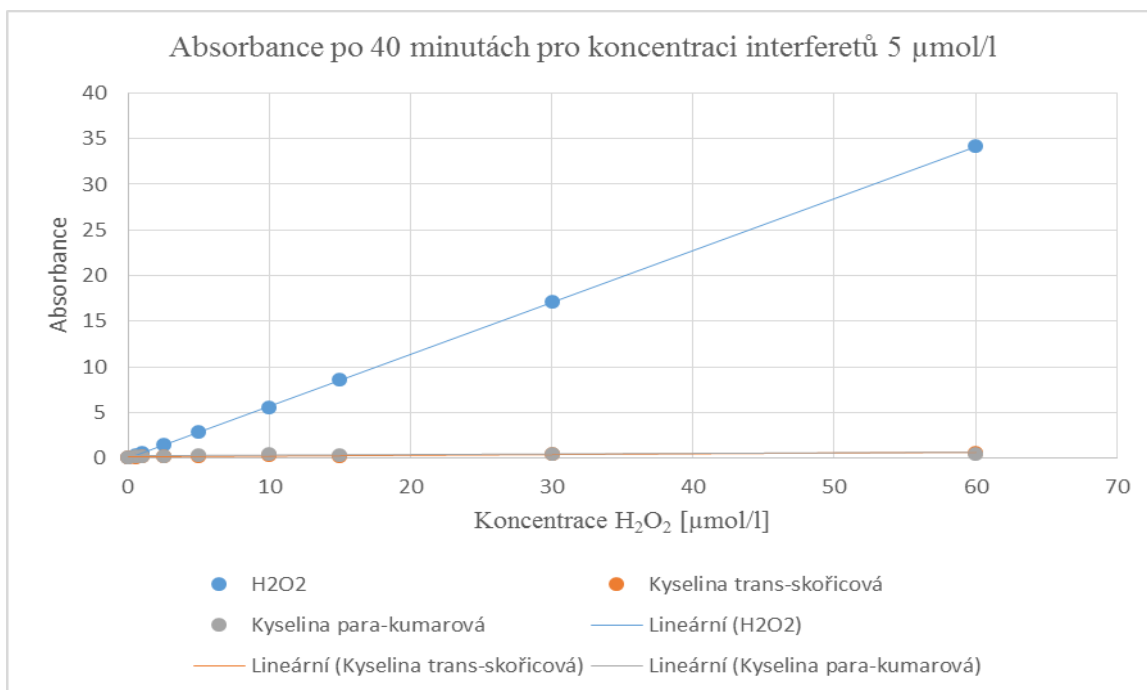
Jako interferující látky u metody s KI byl použity stejné interferenty (kyselina *trans*-skořicová, kyselina *p*-kumarová) jako u předešlé metody, které se běžně vyskytují v přírodě. Úkolem této práce bylo zjistit vliv těchto látek na výsledky získané i touto metodou.

Měření bylo realizováno pro dvě koncentrace u obou daných kyselin (5 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$).

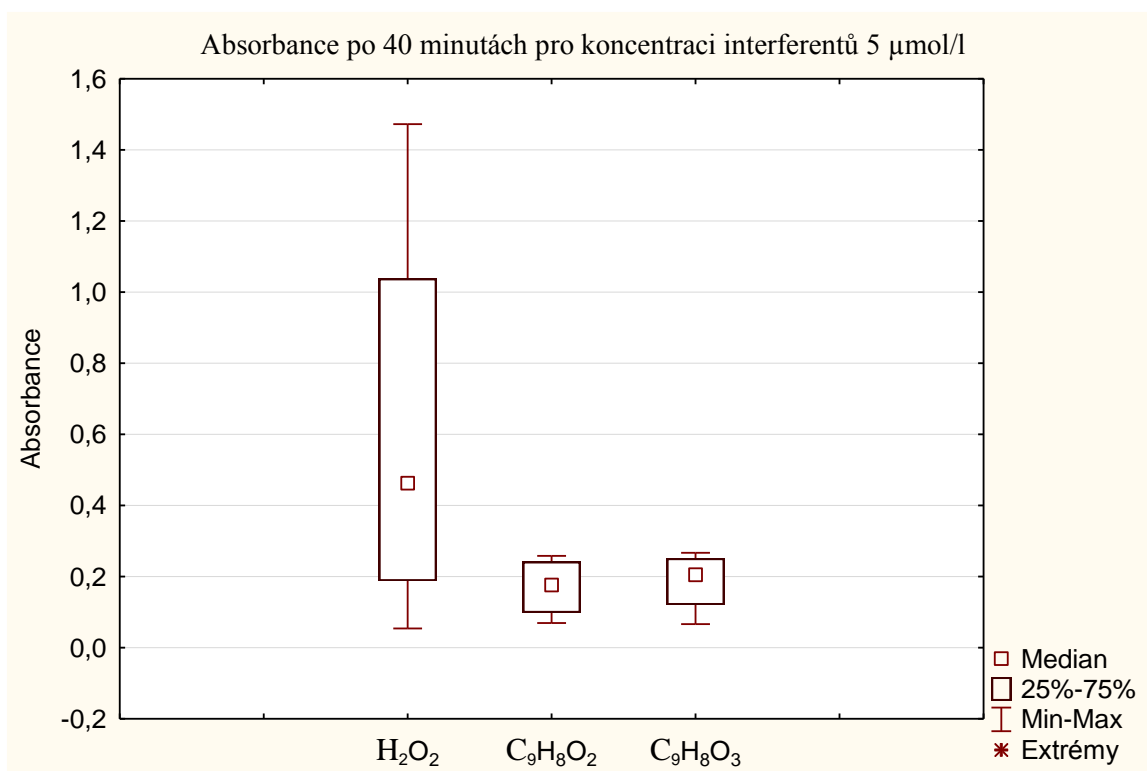
Testování vazeb interferujících látek o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ s KI

Potenciální vliv studovaných látek byl odečten na základě odklonu stanovených kalibračních křivek s nižší koncentrací testovaných interferentů oproti sklonu kalibrační křivky pro peroxid vodíku během reakční doby pro obě vlnové délky. Vliv interferentů byl porovnáván po 40 minutách a po 120 minutách (Obr. 22, Obr. 24, Obr. 26, Obr. 28). Absorbance odpovídající rušivým látkám o nižší koncentraci vykazují značnou změnu průběhu, po jednoduchém porovnání v rámci jednotlivých vzorků byl pozorován velký systematický rozdíl a získané hodnoty se hodně liší od těch, které odpovídají standardu jak v průběhu času, tak pro obě vlnové délky.

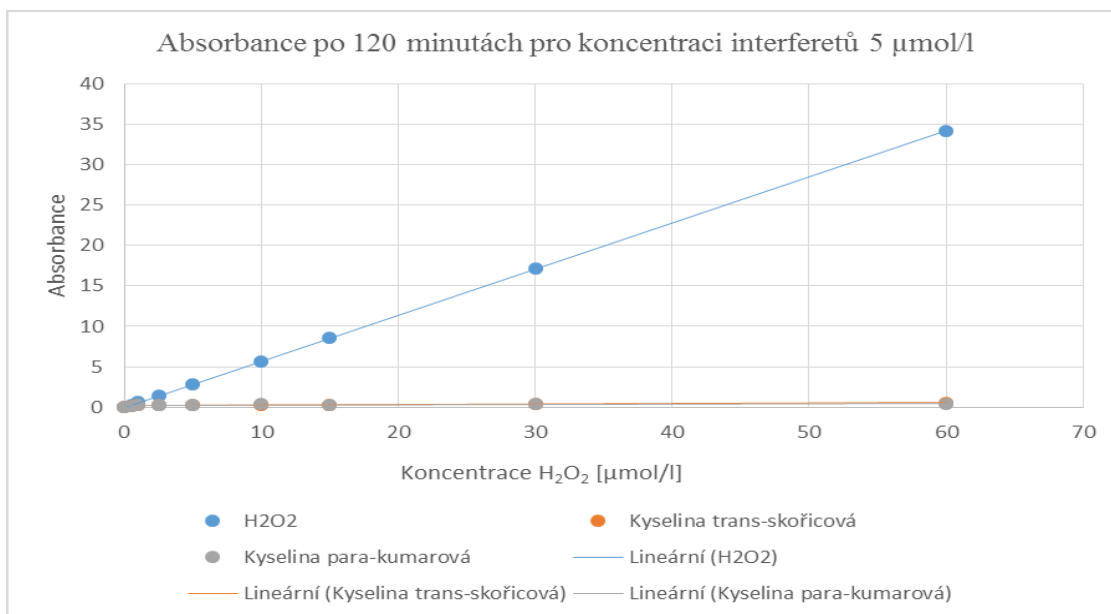
Pro porovnání rozložení hodnot u této metody byly opět použity krabicové grafy. Pro lepší přehlednost byly použity pouze hodnoty absorbancí odpovídající první polovině rozsahu koncentrací H_2O_2 . Z výsledků je vidět značný vliv interferujících látek (Obr. 23, Obr. 25, Obr. 27, Obr. 29). Absorbance roztoků výrazně poklesla.



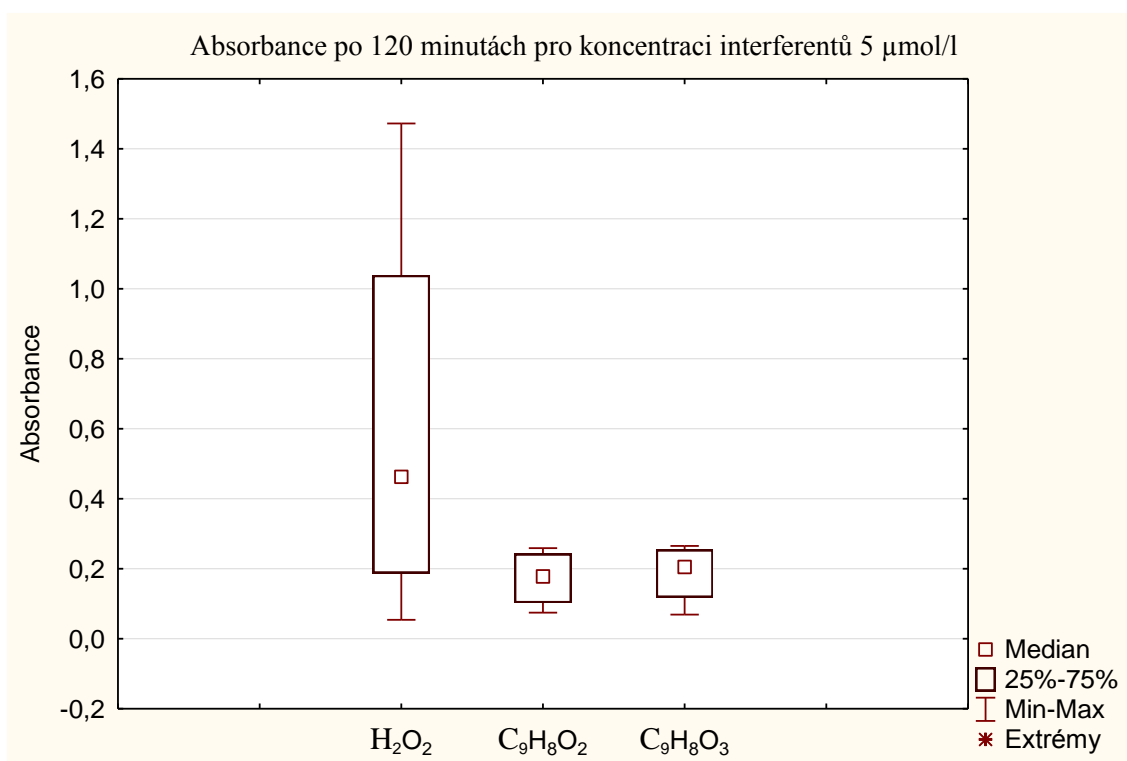
Obr. 22: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 μmol/l po 40 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 410 nm



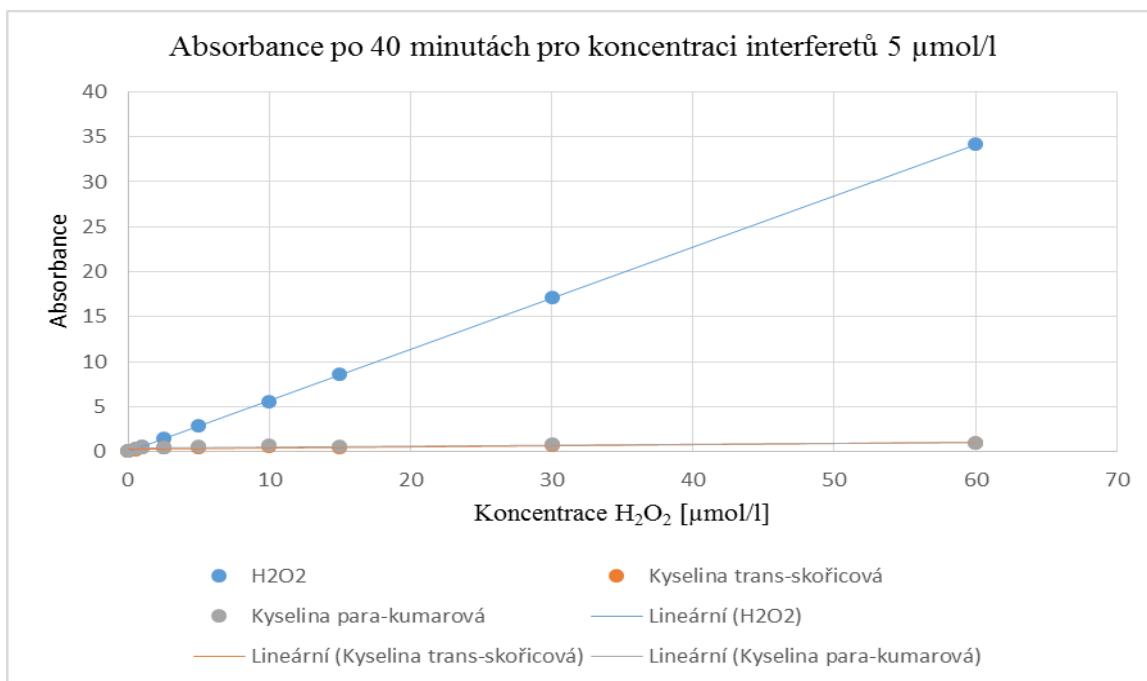
Obr. 23: Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 μmol/l pro KI (410 nm)



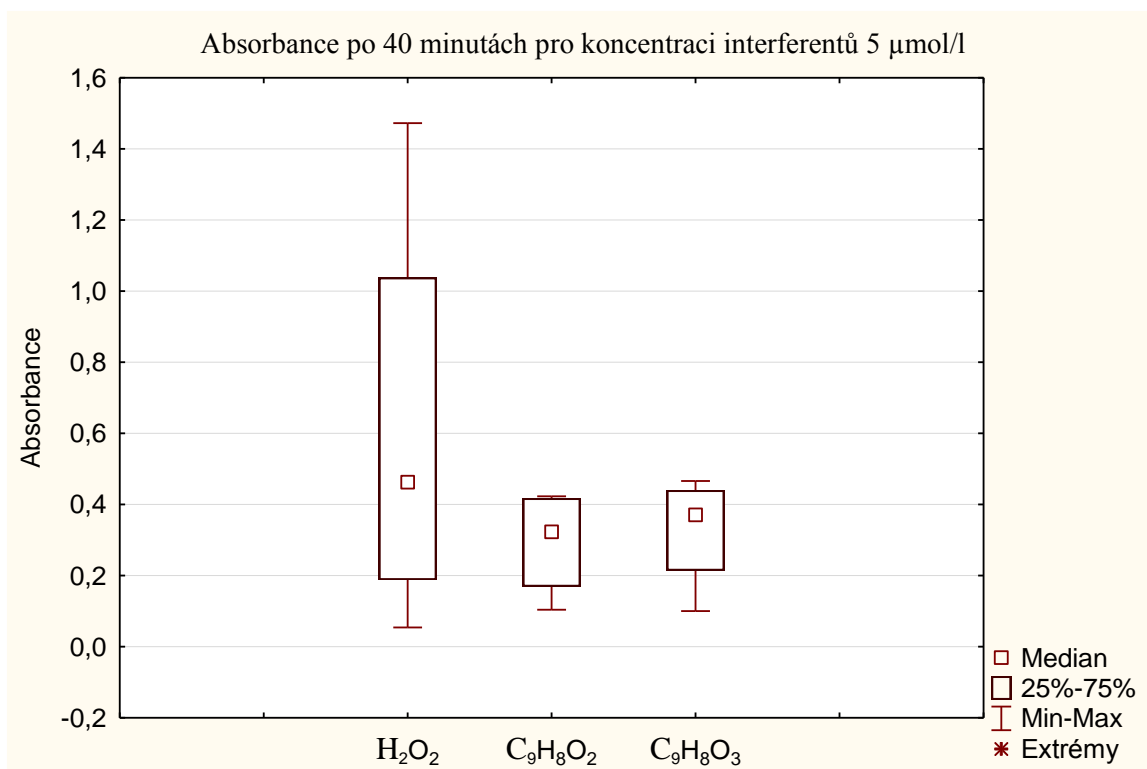
Obr. 24: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 410 nm



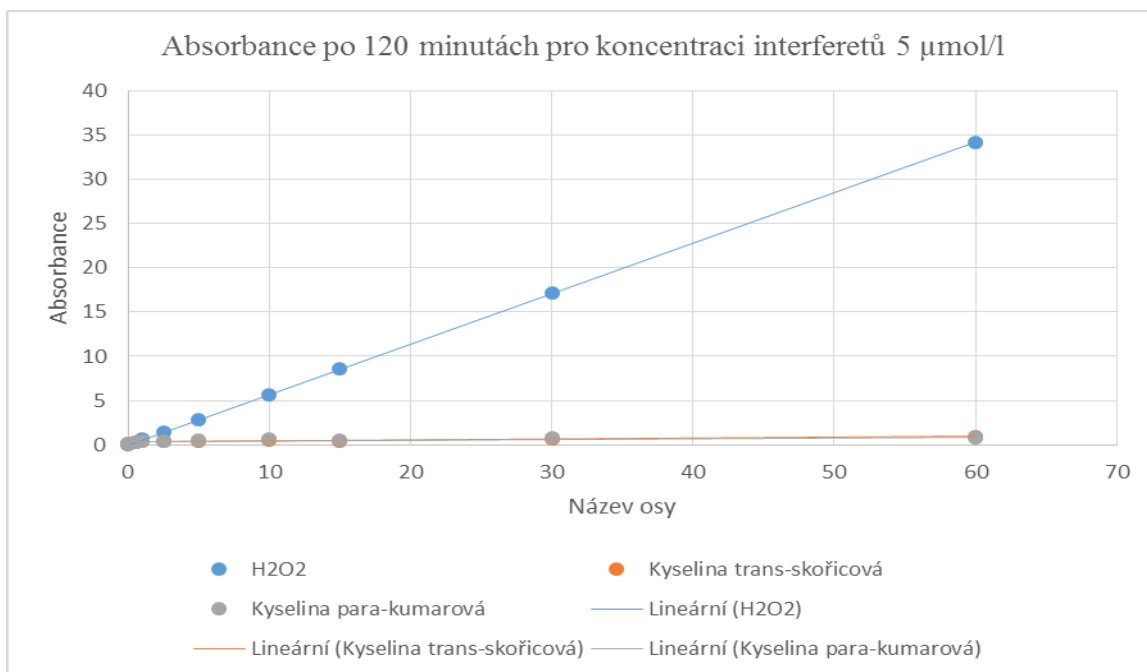
Obr. 25: Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (410 nm)



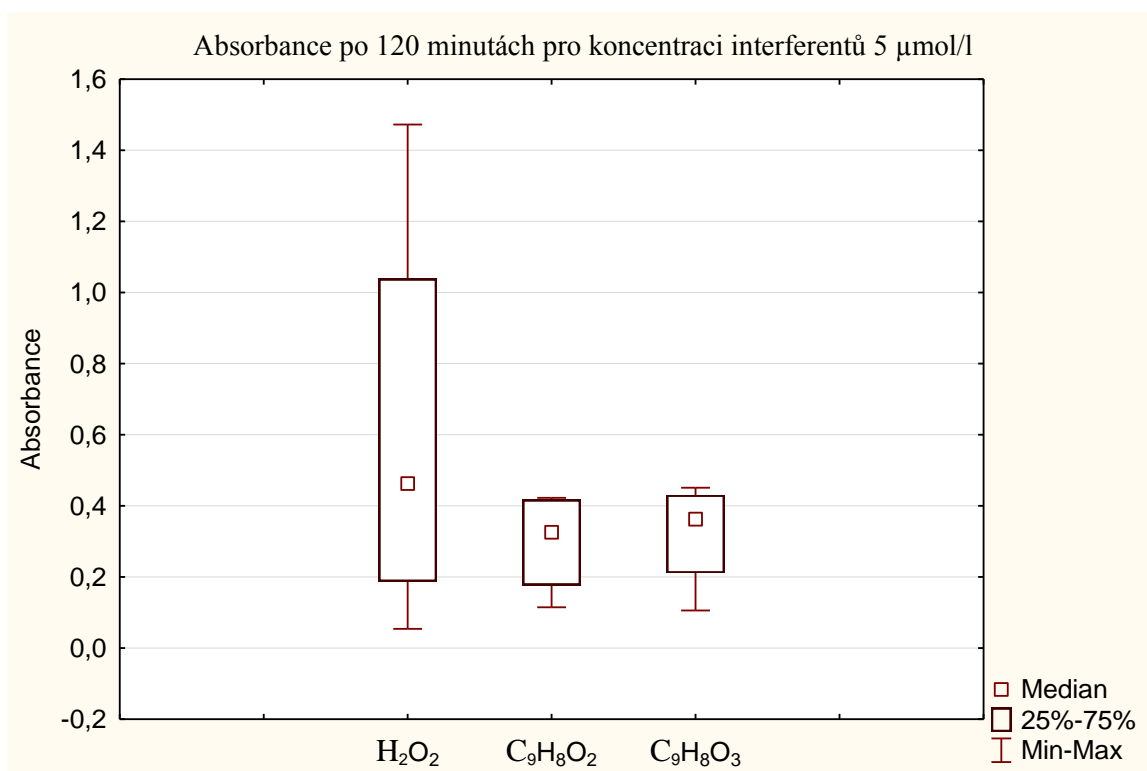
Obr. 26: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 μmol/l po 40 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 390 nm



Obr. 27: Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 μmol/l pro KI (390 nm)



Obr. 28: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 μmol/l po 120 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 390 nm

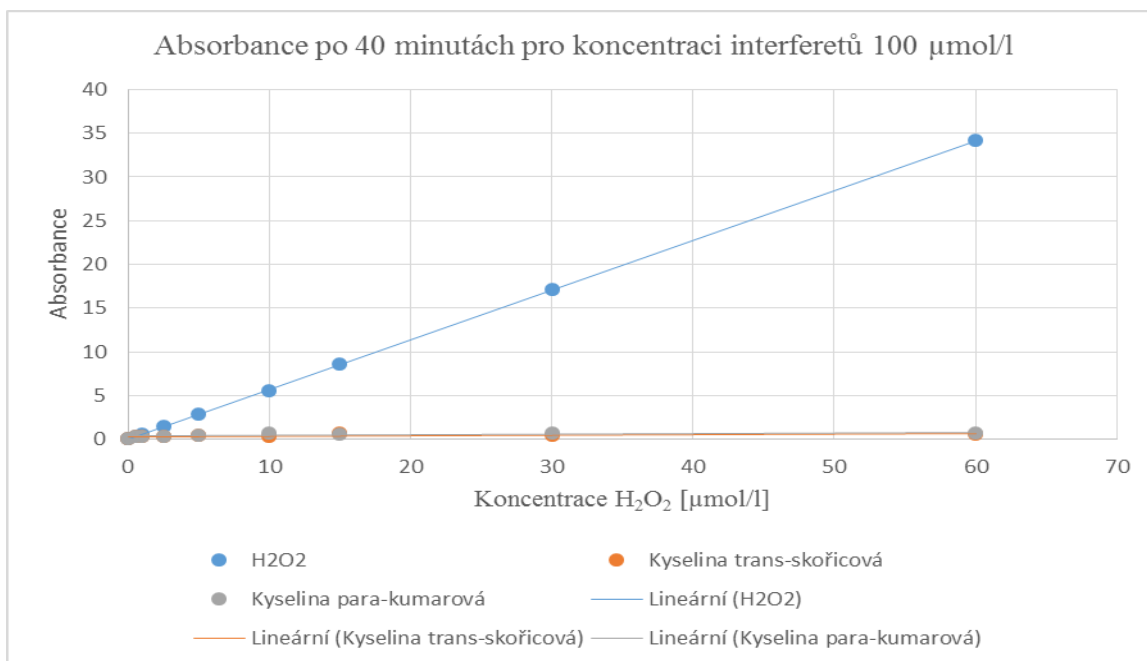


Obr. 29: Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 μmol/l pro KI (390 nm)

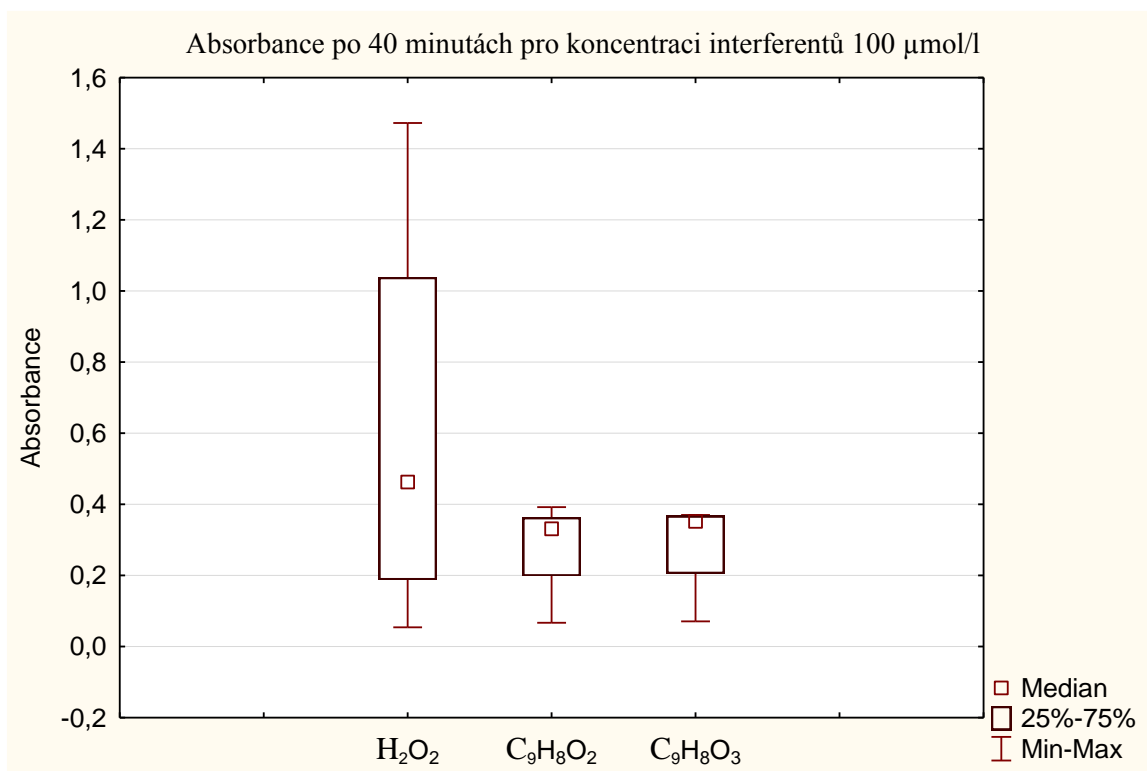
Testování vazeb interferujících látek o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ s KI

Potenciální vliv studovaných látek byl odečten na základě odklonu stanovených kalibračních křivek s nižší koncentrací testovaných interferentů oproti sklonu kalibrační křivky pro peroxid vodíku během reakční doby pro obě vlnové délky. Vliv interferentů byl porovnáván každých po 40 minutách a po 120 minutách (Obr. 30, Obr. 32, Obr. 34, Obr. 36). Absorbance odpovídající rušivým látkám o nižší koncentraci vykazují značnou změnu průběhu, po jednoduchém porovnání v rámci jednotlivých vzorků byl pozorován velký systematický rozdíl a získané hodnoty se hodně liší od těch, které odpovídají standardu jak v průběhu času, tak pro obě vlnové délky.

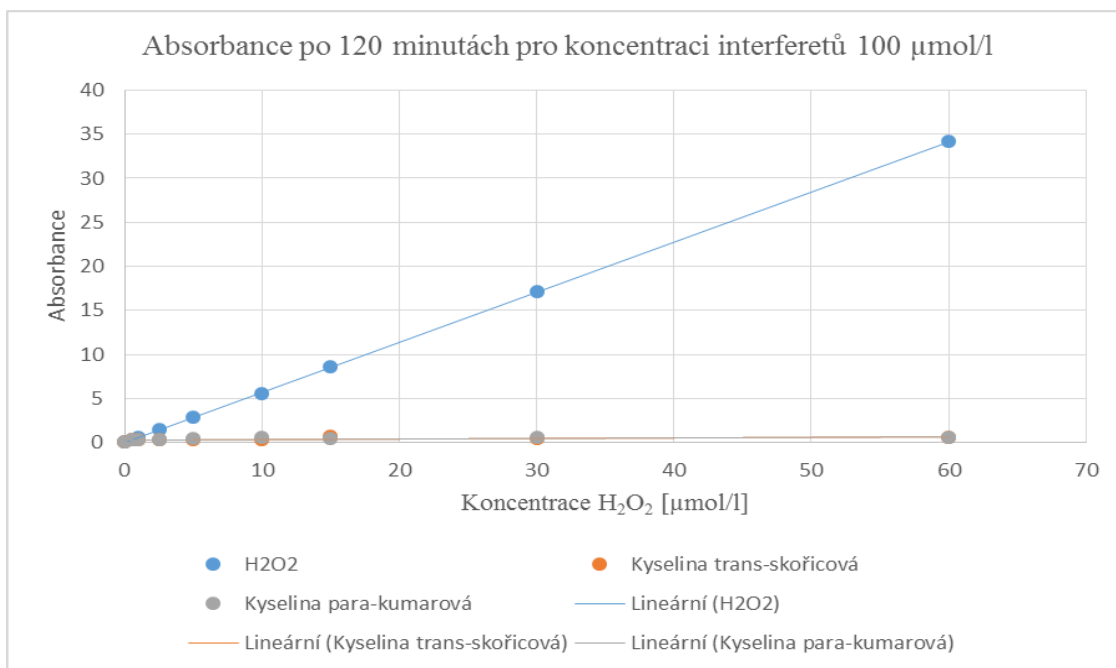
Rozložení hodnot absorbancí se pro vlnovou délku 410 nm tolik neliší od rozložení hodnot ovlivněných nižší koncentrací interferentů (Obr. 31, Obr. 33, Obr. 35, Obr. 37). U měření při vlnové délce 390 nm se toto rozložení hodnot více přibližuje ke kalibračním hodnotám absorbancí.



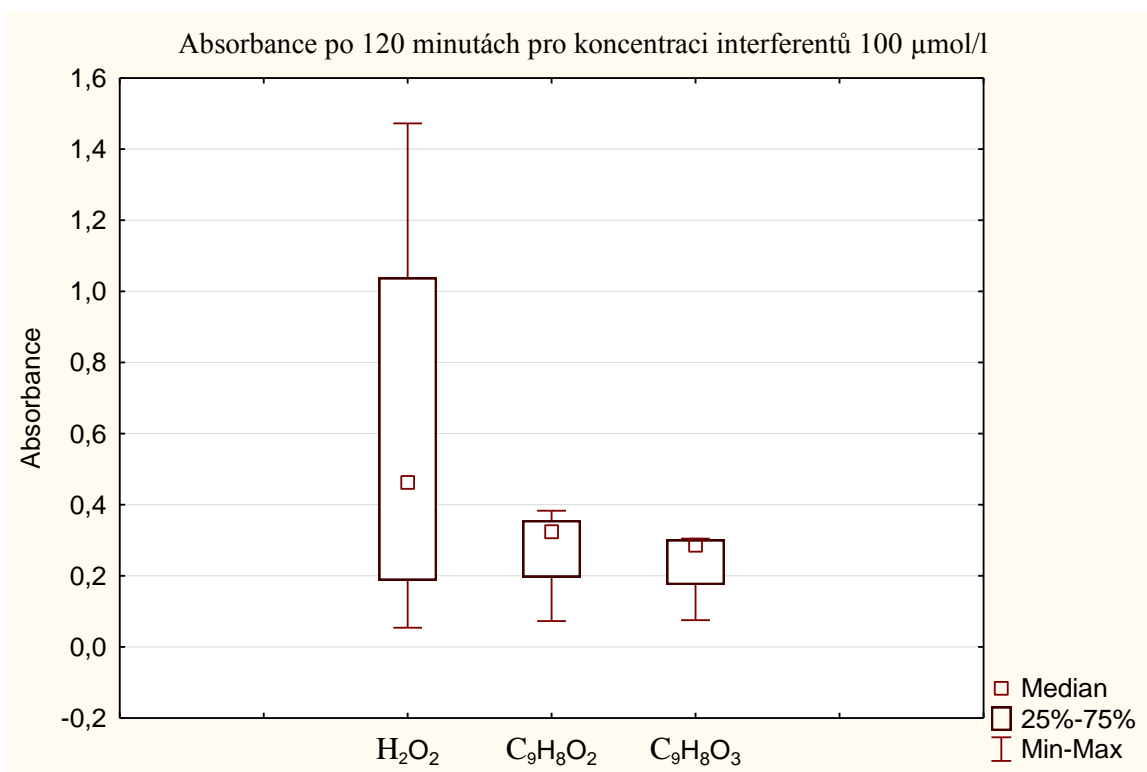
Obr. 30: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 μmol/l po 40 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 410 nm



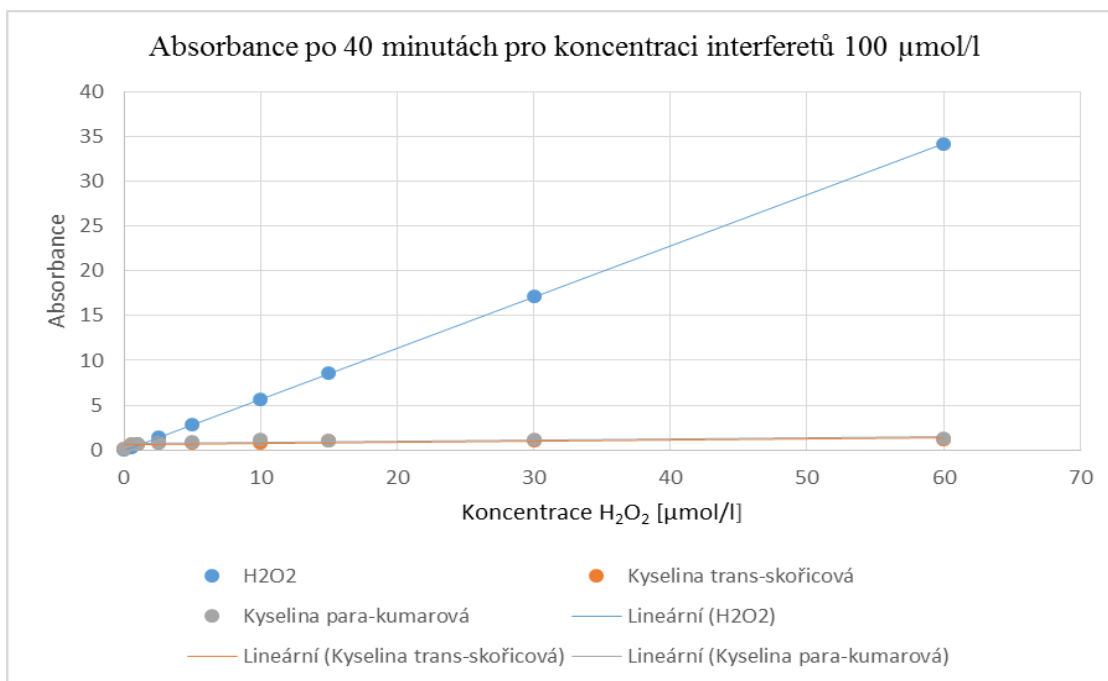
Obr. 31: Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 μmol/l pro KI (410 nm)



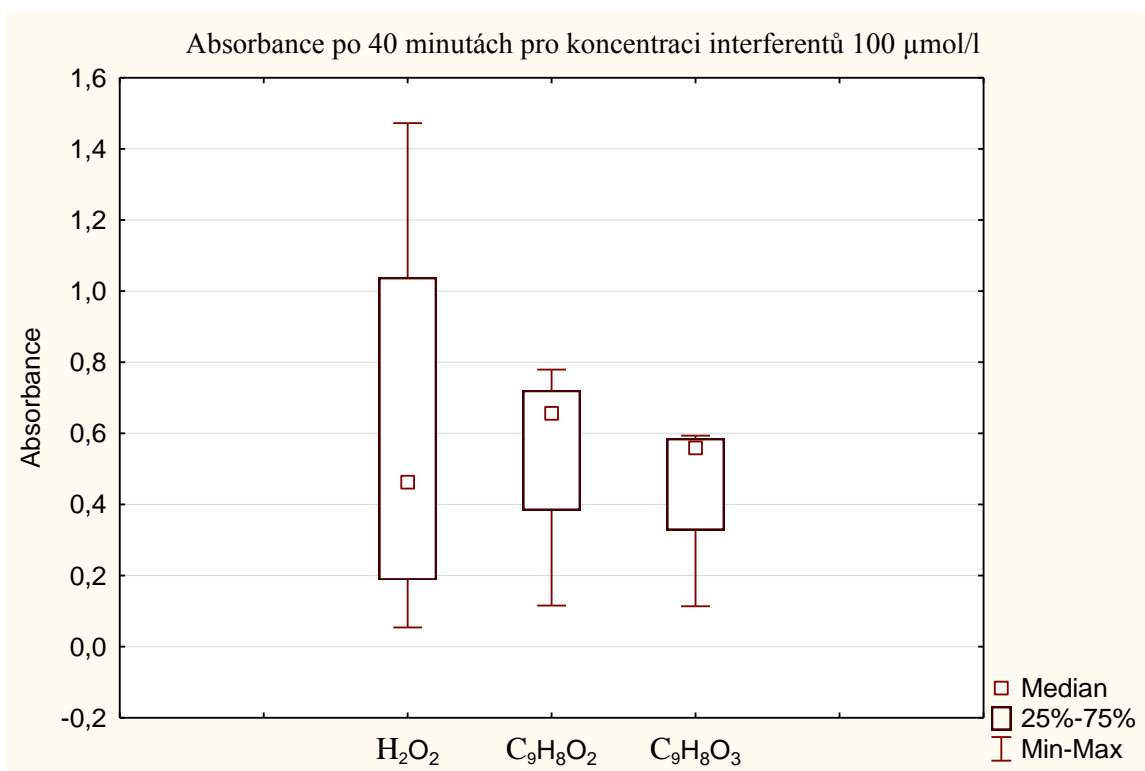
Obr. 32: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 μmol/l po 120 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 410 nm



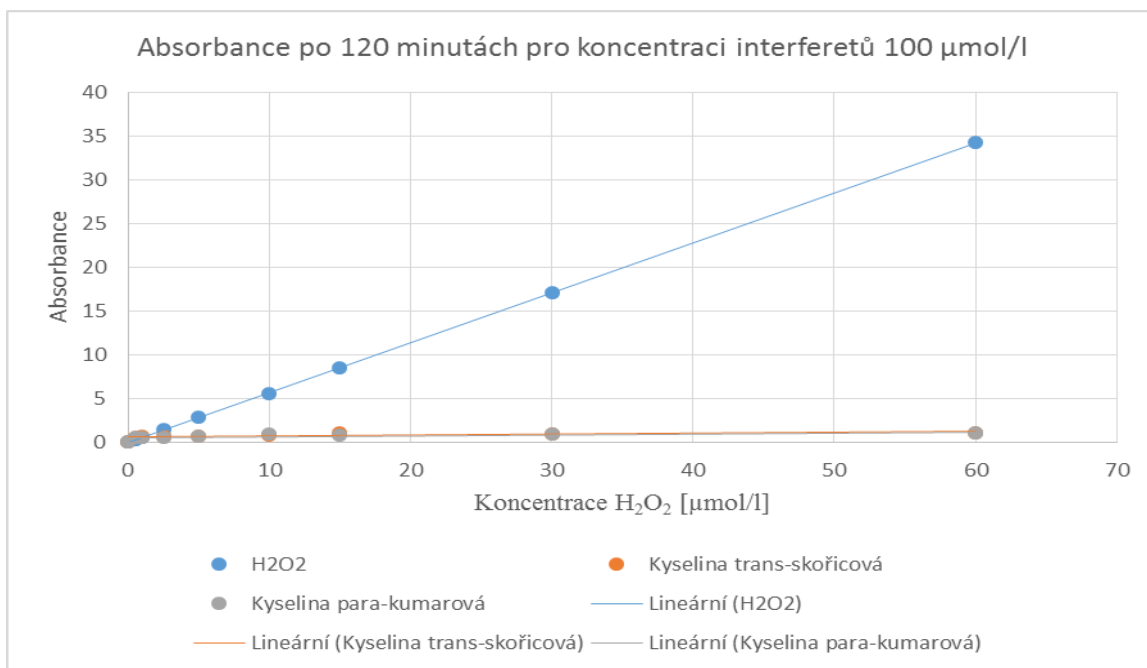
Obr. 33: Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 μmol/l pro KI (410 nm)



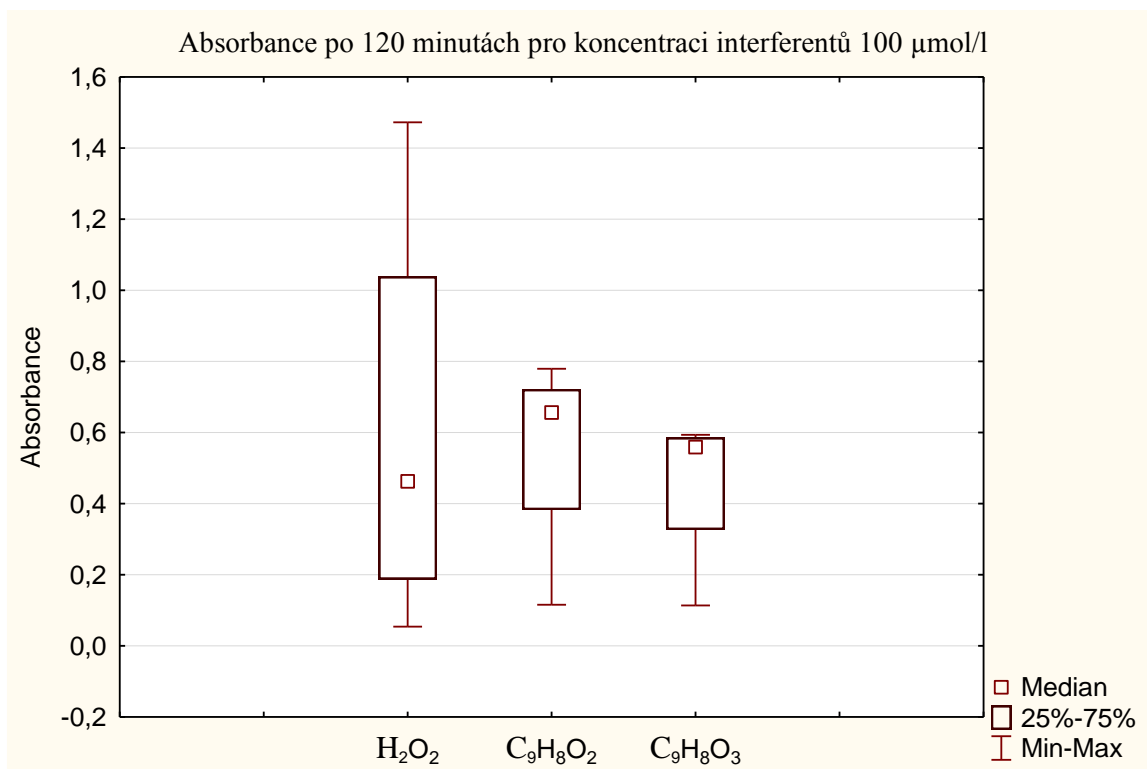
Obr. 34: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 μmol/l po 40 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 390 nm



Obr. 35: Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 μmol/l pro KI (390 nm)



Obr. 36: Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 390 nm



Obr. 37: Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (390 nm)

7 ZÁVĚR

Bez peroxidu vodíku se v přírodě neodehrává téměř nic, je základem všech fyziologických, biochemických a energetických procesů v organismech. Koncentraci peroxidu vodíku lze stanovit řadou metod. Známé jsou metody luminiscenční a titrační, mezi které patří jodometrie, manganometrie nebo cerimetrie. Pro detekci v rostlinách se však nejčastěji používají metody spektrofotometrické díky své jednoduchosti, senzitivitě a díky nenáročnosti na čas a ekonomické náklady.

V této práci bylo pojednáno o několika spektrofotometrických metodách, pro praktické využití byly použity dvě z těchto metod. Metoda využívající, pro měření peroxidu vodíku, chlorid titaničitý a druhá jodid draselný.

Náplní první poloviny této práce je literární rešerše zaměřená na teoretickou aplikaci spektrofotometrických metod v kvalitativní a kvantitativní analýze reaktivních forem kyslíku se zaměřením na peroxid vodíku. Na základě této rešerše byly navrženy vhodné aplikovatelné spektrofotometrické metody na stanovení ROS.

Praktická část této práce se zaměřuje konkrétně na dvě vybrané spektrofotometrické metody pro stanovování ROS. Byla vybrána metoda využívající jodid draselný a metoda využívající chlorid titaničitý. Jedním z úkolů bylo provést posouzení vlivu interferentů na výsledky spektrofotometrické analýzy. Jako interferující látky byly použity dvě kyseliny a to kyselina *trans*-skořicová a *p*-kumarová. Byl sledován a zkoumán vliv těchto interferujících látek na hodnoty absorbance.

Při měření absorbance jednotlivých roztoků u metody využívající TiCl_4 byly nejprve stanoveny kalibrační křivky standardu (H_2O_2) s časovou diferencí 20 minut pro obě vlnové délky (410 nm, 390 nm). Křivky byly stanovovány v programu EXCEL 13. Stejným způsobem byly měřeny absorbance roztoků standardů (peroxidu vodíku) s přidanými interferujícími látkami.

Přítomnost interferentů v roztocích způsobila vychýlení hodnot absorbance roztoků standardů od kalibrační křivky standardu, nicméně vychýlení je minimální a dá se zanedbat. Naopak u metody využívající KI se tyto interferenty projeví podstatně výrazněji. Dalo by se z toho tedy usoudit, že pro stanovování absorbance roztoků obsahující dané interferenty je lepší použít první ze zmíněných metod a to metodu s chloridem titaničitým. Toto tvrzení podporují i výsledky z boxplotů. U metody využívající jako činidlo TiCl_4 se rozložení hodnot v boxplotech téměř rovná hodnotám absorbancí standardu. Naopak u metody využívající KI se toto rozložení hodnot výrazně

vzdaluje od hodnot absorbancí standardu H₂O₂.

U statistického vyhodnocování naměřených dat byl nejprve použit Wilcoxonův test pro párové hodnoty. Při porovnávání hodnot naměřených metodou využívající TiCl₄ tento test prokázal, že se jedná o párové hodnoty. Odchytky mezi hodnotami byly minimální. Pomocí Kruskal – Wallisova testu byly porovnány časové průběhy absorpance. Distribuční funkce se v podstatě nelišili. Při vyhodnocování dat získaných pomocí druhé metody (KI), byly výsledky zcela odlišné. Wilcoxonův test sice prokázal, že se jedná o párové hodnoty, ale K – W test potvrdil výše uvedené závěry o této metodě.

Výsledkem této práce je zjištění, že z metod použitých pro stanovování ROS, je vhodná pouze metoda využívající chlorid titaničitý. Metoda využívající jodid draselný je pro tuto analýzu zcela nevhodná.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1:	Absorbance	9
Obr. 2:	Kalibrační křivky standardu (H_2O_2) pro TiCl_4 metodu (410 nm)	27
Obr. 3:	Kalibrační křivky standardu (H_2O_2) pro TiCl_4 metodu (390 nm).....	29
Obr. 4:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 410 nm	31
Obr. 5:	Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (410 nm)	31
Obr. 6:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 410 nm	32
Obr. 7:	Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (410 nm)	32
Obr. 8:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 390 nm	33
Obr. 9:	Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (390 nm)	33
Obr. 10:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 390 nm	34
Obr. 11:	Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (390 nm)	34
Obr. 12:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 410 nm	36
Obr. 13:	Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (410 nm)	36
Obr. 14:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 410 nm	37
Obr. 15:	Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o	

	koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (410 nm).....	37
Obr. 16:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 390 nm	38
Obr. 17:	Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (390 nm)	38
Obr. 18:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s TiCl_4 při vlnové délce 390 nm	39
Obr. 19:	Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro TiCl_4 (390 nm)	39
Obr. 20:	Kalibrační křivky standardu (H_2O_2) pro KI metodu (410 nm)	42
Obr. 21:	Kalibrační křivky standardu (H_2O_2) pro KI metodu (390 nm)	44
Obr. 22:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 410 nm	46
Obr. 23:	Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (410 nm).....	46
Obr. 24:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 410 nm	47
Obr. 25:	Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (410 nm).....	47
Obr. 26:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 390 nm	48
Obr. 27:	Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (390 nm).....	48
Obr. 28:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 390 nm	49
Obr. 29:	Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (390 nm).....	49
Obr. 30:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100	

	$\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 410 nm	51
Obr. 31:	Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (410 nm).....	51
Obr. 32:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 410 nm	52
Obr. 33:	Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (410 nm).....	52
Obr. 34:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 40 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 390 nm	53
Obr. 35:	Rozložení hodnot absorbance po 40 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (390 nm).....	53
Obr. 36:	Absorbance peroxidu vodíku a interferujících kyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 120 minutách pro metodu s KI při vlnové délce 390 nm	54
Obr. 37:	Rozložení hodnot absorbance po 120 minutách pro oba interferenty o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ pro KI (390 nm).....	54

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
FOX	Ferrous ion oxidation xylenol orange
P	Výstupní zářivý tok
P ₀	Vstupní zářivý tok
A	Absorbance
T	Transmittance
ϵ_{λ}	Lineární koeficient absorpce
c	Koncentrace roztoku
b	Tloušťka absorbující vrstvy
UV	Ultrafialové záření

10 LITERATURA

- [1] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001, 381 s. ISBN 80-902-8961-4.
- [2] HRAZDIRA, Ivo; MORNSTEIN, Vojtěch. *Biofyzikální principy lékařské přístrojové techniky*. Brno : Masarykova univerzita-Lékařská fakulta, 1999.
- [3] DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2010. 131 s. ISBN 978-80-210-4226-1.
- [4] FIŠEROVÁ, Gabriela. *Spektrofotometr - metodika a možnosti praktického využití*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [5] PROCHÁZKA, Stanislav. *Botanika: morfologie a fyziologie rostlin*. Vyd. 3., nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 242 s. ISBN 978-80-7375-125-8.
- [6] HRAZDIRA, Ivo. *Biofyzika : učebnice pro lékařské fakulty*. Praha : Avicenum, 1990.
- [7] BERČÍK, Juraj a Dušan BUSTIN. *Fyzikálne a fyzikálno-chemické analytické metódy*. 1. vyd. Bratislava: ALFA, vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1977. 502 s.
- [8] HOLZBECHER, Závaš., Churáček, Jaroslav a kol., *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987. 663 s.
- [9] KLOUDA, Pavel.: *Moderní analytické metody*. 2. uprav. a dopl. Vydání, Ostrava, 2003. 132 s.
- [10] KLAPHECK S., Zimmer I., Cosse H., Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol*, 1990.
- [11] GRAF E., Penniston J. T., Method for determination of hydrogen peroxide, with its application illustrated by glukose essay. *Clin. Chem.*, 1980
- [12] MILLINGTON K. R., Maurdev G., The generation of superoxide and hydrogen

- peroxide by exposure of fluorescent whitening agents to UVA radiation and its relevance to the rapid photoyellowing of whitened wool. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2004
- [13] ELNEMMA E. M., Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide by a hydroquinone-aniline system catalyzed by molybdate. *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 2004
- [14] DAMODARAN, Srinivasan, Kirk PARKIN a Owen R FENNEMA. Fennema's food chemistry. 4th ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, c2008, 1144 p. ISBN 0849392721.
- [15] MEISNER, P. and J. L. GEBICKI. Determination of Hydroperoxides in Aqueous Solutions Containing Surfactants by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Method. *Acta Biochimica Polonica*. 2009, 56(3), p. 523 – 527
- [16] ZHOU M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Application in detecting the activity phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.*, 1997
- [17] SEKI M., Iida K., Saito M., Nakayama H., Yoshida S., Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: Involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *J. Bacteriol.*, 2004
- [18] ANGELINI R., Frederico R., Bonfante P. Maize polyamineoxidase: antibody production and ultrastructural localization. *J. Plant Physiol.*, 1995
- [19] BAHRAMI, Kiumars, Mohammad M KHODAEI and Donya KHALEDIAN. Synthesis of sulfonyl chlorides and thiosulfonates from H₂O₂-TiCl₄. *Tetrahedron Letters* [online]. 2012, roč. 53, č. 3, s. 354–358. doi 10.1016/j.tetlet.2011.11.052. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403911019939>.

Zdroje ilustrací

- [I] http://en.academic.ru/pictures/enwiki/66/Beer_lambert.png
- [II] FIŠEROVÁ, Gabriela. *Spektrofotometr - metodika a možnosti praktického využití*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [III] PETŘIVALSKÝ, Marek. *Experimentální metody studia obranné reakce rostlin*. Olomouc, 2010. Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie.